

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen

Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

Angefertigt am Lehrstuhl für Orthopädie,
Universität Regensburg, Abt. Experimentelle Orthopädie
(Priv.-Doz. Dr. Susanne Grässel)

DIE CHONDROPROTEKTIVE ROLLE DES MELANOCORTIN-SYSTEMS BEI OSTEOARTHROSE

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Gerit Irene Hackmayer
aus Regensburg

München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Valeri Zakhartchenko

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1

1.1 Das Knorpelgewebe	1
1.1.1 Der hyaline Knorpel – molekulare Struktur	1
1.1.1.1 Kollagene	2
1.1.1.2 Proteoglykane	2
1.1.2 Der hyaline Knorpel – supramolekulare Struktur	2
1.2 Osteoarthritis	4
1.2.1 Die Ätiologie der Osteoarthritis	5
1.2.1.1 Mechanische Belastung	5
1.2.1.2 Genetische Faktoren	5
1.2.1.3 Altersbedingte Veränderungen	6
1.2.2 Die Pathogenese der Osteoarthritis	6
1.2.2.1 Chondrozyten	7
1.2.2.2 Inflammation	7
1.2.2.3 Subchondraler Knochen	8
1.2.3 Osteoarthritis im Mausmodell	8
1.3 Das Melanocortinsystem	9
1.3.1 Die Melanocortine	9
1.3.2 Die Melanocortin-Rezeptoren	10
1.3.3 Melanocortine im osteoartikulären System	12
1.3.3.1 Synovialgewebe	12
1.3.3.2 Knorpelgewebe	12
1.3.3.3 Knochengewebe	13
1.3.4 Effekte von Melanocortinen im osteoartikulären System	13
1.3.4.1 Anti-Inflammation	13
1.3.4.2 Längenwachstum und Knochenvolumen	14
1.3.5 Die MC-1R-signaldefiziente Maus	14

2. ZIEL DER ARBEIT

16

3. MATERIAL UND METHODEN

17

3.1 Material	17
3.1.1 Verbrauchsartikel	17
3.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel	18
3.1.3 Antikörper und Enzyme	18
3.1.4 Anästhetika und Analgetika	18
3.1.5 Geräte	19
3.1.6 Lösungen	19
3.1.7 Versuchstiere und Tierhaltung	21
3.1.8 Software und Internetdienste	22
3.2 Methoden	22
3.2.1 Chirurgische Induktion einer Osteoarthritis	22
3.2.2 Histologische und immunohistochemische Methoden	24
3.2.2.1 Probenaufbereitung	24
3.2.2.2 Safranin O/Fast Green-Färbung	25
3.2.2.3 Typ-II Kollagen-Färbung	26
3.2.3 Evaluierung der OA	29
3.2.3.1 Evaluierung des artikulären Knorpels	29
3.2.3.2 Evaluierung der SKP	30
3.2.3.3 Statistik	31

4. ERGEBNISSE

32

4.1 Charakterisierung des gesunden Kniegelenks von MC-1Re/e-Mäusen	35
4.1.1 Beobachtungen im artikulären Knorpel	35
4.1.2 Beobachtungen in der SKP	38
4.2 Charakterisierung des Kniegelenks von MC-1Re/e-Mäusen im Verlauf einer Osteoarthritis	41
4.2.1 Die chirurgische Induktion der Osteoarthritis durch Destabilisierung des medialen Meniskus	41
4.2.1.1 Beobachtungen im artikulären Knorpel	42
4.2.1.2 Beobachtungen in der SKP	46
4.2.2 Der Verlauf der Osteoarthritis bei MC-1Re/e-Mäusen	49
4.2.2.1 Beobachtungen im artikulären Knorpel	49
4.2.2.2 Beobachtungen in der SKP	54

5. DISKUSSION

58

5.1 DMM löst eine milde bis moderate Osteoarthritis aus	58
5.2 MC-1R-Signalweg nimmt im Initialstadium der Osteoarthritis Einfluss auf den artikulären Knorpel	59
5.3 MC-1R-Signalweg nimmt im Verlauf einer Osteoarthritis Einfluss auf den Geschlechtsdimorphismus im artikulären Knorpel	61
5.4 MC-1R-Signalweg nimmt Einfluss auf die SKP	62
5.5 Fazit und Ausblick	64

6. ZUSAMMENFASSUNG

66

7. SUMMARY	68
------------	----

.....

8. LITERATURVERZEICHNIS	70
-------------------------	----

.....

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	77
--------------------------	----

.....

10. DANKSAGUNG	79
----------------	----

1. EINLEITUNG

1.1 DAS KNORPELGEWEBE

Knorpelgewebe stellt hochspezialisiertes Gewebe dar, das aus nur einem Zelltyp (Chondrozyten) und extrazellulärer Matrix (EZM) besteht und oft von einer schützenden, ernährenden und regenerativen Knorpelhaut (Perichondrium) umgeben ist. Es ist avaskulär, alymphatisch und nicht innerviert. Basierend auf histologischen, biochemischen und biomechanischen Eigenschaften kann man drei Arten von Knorpelgewebe unterscheiden: den Faserknorpel, den elastischen Knorpel und den hyalinen Knorpel.

Der Faserknorpel (auch Bindegewebsknorpel genannt) ist zum Beispiel in den Bandscheiben oder im Meniskus zu finden. Dieser Knorpeltyp besteht aus sehr wenigen Zellen und sehr viel EZM und ist in der Lage, hohe Scherkräfte auszuhalten.

Der elastische Knorpel ist dagegen sehr zellreich. Er besitzt eine hohe Biege- und Druckelastizität, da seine EZM unter anderem Fibrillin und Elastin enthält. Man findet ihn beispielsweise in der Ohrmuschel, in den Bronchien und im Kehildeckel.

Der hyaline Knorpel weist sehr hohe Druckelastizität auf, weshalb er hauptsächlich auf stark belasteten Stellen des Körpers vorkommt wie im Kniegelenk und Hüftgelenk, aber auch in Luftröhre oder Nase. Er besteht hauptsächlich aus Chondrozyten und aus der von ihnen gebildeten EZM (1).

1.1.1 DER HYALINE KNORPEL – MOLEKULARE STRUKTUR

Spalthaltige oder echte Gelenke (Diarthrosen), zu denen auch das Kniegelenk gehört, sind mit hyalinem Knorpel ausgekleidet. Außerdem ist hier eine von Synovium umgebene Gelenkhöhle vorhanden, die Synovialflüssigkeit enthält. Das Knorpelgewebe enthält keine Blutgefäße und wird nur am Rande innerviert, so dass die Sauerstoff- und Nahrungszufuhr der Chondrozyten über Diffusion aus umliegenden Geweben stattfindet. Aus dieser Eigenschaft ergibt sich ein nur begrenztes Potential für Wachstum und Reparatur (2).

In hyalinem Knorpel stellen Chondrozyten den einzigen Zelltyp dar. Sie sind in der EZM eingebettet, die den Großteil des Gesamt-Knorpelvolumens bildet. Sie besteht aus einem

Netz aus Kollagenfasern, das mit Proteoglykanen und anderen nicht-kollagenen Matrix-Proteinen verknüpft ist. Alle Bestandteile der EZM werden von den Chondrozyten produziert (3).

1.1.1.1 KOLLAGENE

Kollagene sorgen für die Festigkeit und Steifigkeit im Knorpel. Sie werden von den Chondrozyten gebildet und als Tripelhelices, die aus drei über Disulfidbrücken verknüpften α -Polypeptidketten bestehen, aus der Zelle geschleust. Dort lagern sie sich nach Abspaltung eines Propeptids spontan zusammen und bilden durch kovalente Quervernetzungen die Kollagenfasern. Kollagene nehmen 60 % der Trockenmasse des Knorpels ein, wobei Typ-II Kollagen mit 90-95 % des Gesamt-Kollagens den Hauptbestandteil ausmacht. Zusammen mit Typ-IX und Typ-XI Kollagen bildet es eine heterofibrilläre Struktur und das typische quergestreifte Muster (4).

1.1.1.2 PROTEOGLYKANE

Proteoglykane können in große Proteoglykane (wie Aggrecan), kleine leucinreiche Proteoglykane oder SLRPs (*small leucin-rich proteoglycans*, wie Decorin und Biglycan) und Adaptorproteine (wie Fibronectin, Tenascin, Matrilin und COMP) eingeteilt werden. Sie sorgen für die Druckelastizität im Knorpel. Als Hauptbestandteil der Proteoglykane der hyaluronhaltigen EZM des artikulären Knorpels gilt Aggrecan, auch Decorin, Biglycan und Fibromodulin kommen vor (5). Aggrecan besteht aus einem linearen Kernprotein und sulfathaltigen Glykosaminoglykan-Seitenketten (GAGs). Diese sind aus sich wiederholenden Disacchariden aufgebaut. Die Carboxyl- oder Sulfatgruppen dieser Seitenketten bedingen die negative Ladung und damit die Wasserbindungsfähigkeit von Proteoglykanen (65-80 % des Knorpels bestehen aus Wasser). Durch diese Wasserbindungsfähigkeit und die ladungsabhängige Abstoßung der Moleküle untereinander wird ein Quellungsdruck verursacht, der die Belastung abdämpft (6). Außerdem erlaubt das enthaltene Wasser Nährstoffaufnahme, Deformation und besseres Gleiten der Gelenkoberflächen (7).

1.1.2 DER HYALINE KNORPEL – SUPRAMOLEKULARE STRUKTUR

Der humane artikuläre Knorpel kann in eine unkalzifizierte und eine kalzifizierte Schicht eingeteilt werden, die wiederum aus verschiedenen Zonen bestehen (Abb. 1.1) (1, 2, 8).

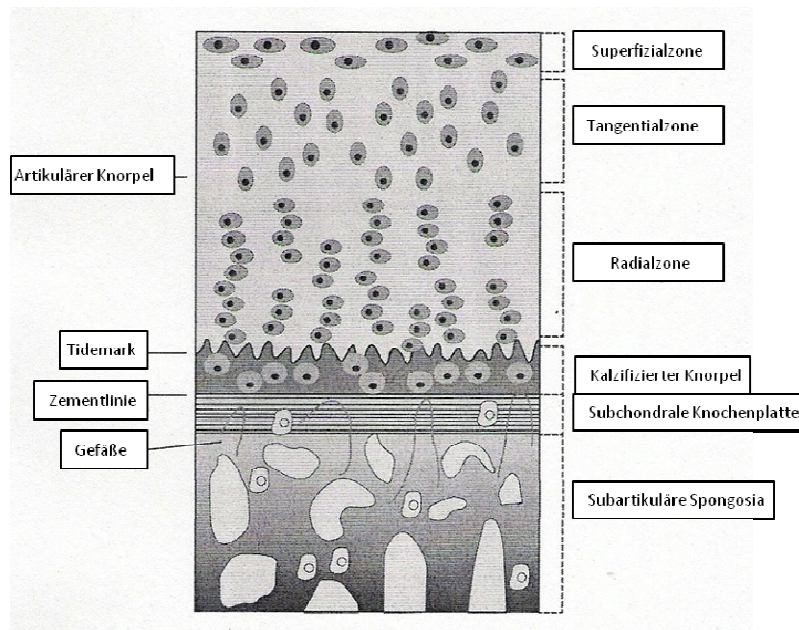


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Zonen des humanen artikulären Knorpels in einem adulten spalthaltigen Gelenk (aus Böhm, Grässel, 2012 (3)).

Die **unkalzifizierte Schicht** besteht aus drei Zonen:

- der oberflächlichen Zone (Superficialzone) mit dünnen Kollagenfasern, einem hohen Anteil an Decorin, einer geringen Konzentration an Aggrecan und flachen scheibenförmigen Chondrozyten.
- der mittleren Zone (Tangentialzone) mit gebündelten, dickeren Kollagenfasern und kugelförmigen Chondrozyten.
- der tiefen Zone (Radialzone) mit dicken Kollagenbündeln, dem höchsten Anteil an Proteoglykan und kugelförmigen, säulenartig angeordneten Chondrozyten.

Die **kalzifizierte Schicht** ist von der unkalzifizierten Schicht durch die sogenannte Tidemark getrennt und besteht aus einer Zone:

- der kalzifizierten Knorpelzone mit kugelförmigen Chondrozyten und ohne Proteoglykan. Sie befindet sich direkt oberhalb des subchondralen Knochens. Diese Schicht dient als mechanischer Puffer zwischen dem unkalzifizierten Knorpel und dem subchondralen Knochen.

Unterhalb der beiden Schichten befindet sich die **subchondrale Knochenplatte** (SKP), die den hyalinen artikulären Knorpel vom Knochenmark trennt. Diese Platte besteht wiederum aus zwei Schichten:

- der **mineralisierten Schicht** oder auch **Zementlinie**, die direkt an die darüberliegende kalzifizierte Schicht des Knorpels angrenzt.

- dem **lamellären Knochen**, der mit dem Knochenmark in Verbindung steht und die subartikulären Trabekel bildet.

Zusammen mit der subartikulären Spongiosa bildet die SKP den **subchondralen Knochen**, der im Gegensatz zum artikulären Knorpel vaskularisiert ist (9).

Im humanen artikulären Knorpel ist die unkalzifizierte Schicht deutlich dicker als die kalzifizierte Schicht. Bei der Maus ist die kalzifizierte Schicht hingegen fast so dick wie die unkalzifizierte, die im hier nur wenige Zellschichten aufweist. Deshalb kann im murinen Knorpel keine klare Trennung zwischen den verschiedenen Zonen gezogen werden (10).

Zusätzlich zu diesen horizontal angeordneten EZM-Bereichen ist auch eine kreisförmig angeordnete Matrix um jeden Chondrozyten zu finden, die in eine perizelluläre, eine territoriale und eine interterritoriale Schicht eingeteilt werden kann. Die perizelluläre Matrix umgibt die Chondrozyten komplett, sie besteht aus dünnen Typ-VI Kollagen-Fasern, die mit nicht-kollagenen Proteinen und kleinen Proteoglykanen wie Decorin und Biglycan verknüpft sind (11). Die territoriale und die interterritoriale Matrix enthalten Netzwerke aus Kollagenfasern mit unterschiedlichen Durchmessern, wobei die dicksten Fasern in der interterritorialen Matrix zu finden sind. Das Haupt-Kollagen ist hier Typ-II Kollagen, wobei Typ-XI Kollagen im Faserzentrum und Typ-IX Kollagen an der Faseroberfläche zu finden sind (12).

1.2 OSTEOARTHROSE

Osteoarthritis (OA) ist eine degenerative Gelenkserkrankung, die nicht nur durch Knorpeldegeneration, sondern auch durch intraartikuläre Inflammation und Veränderungen in periartikulärem und subchondralen Knochen gekennzeichnet ist (13). Sie ist die häufigste Form der arthritischen Erkrankungen und eine der Hauptursachen für chronische Schmerzen. Die Mehrheit der über 65-Jährigen zeigt radiologische und/oder klinische Symptome, die bis hin zu Versteifung und Mobilitätsverlust reichen, meist an Händen, Knien, Hüfte und Wirbelsäule (14).

Durch anatomische Analysen und Anwendung histopathologischer und radiologischer Techniken konnte die Entstehung der OA in letzter Zeit genauer definiert werden, auch wenn die Ursache dieser multifaktoriellen Erkrankung noch immer nicht ganz geklärt ist.

Wegen Therapien und Folgebehandlungen ist auch der Kostenfaktor im Gesundheitswesen enorm. Da der Bevölkerungsanteil der älteren Menschen in der westlichen Welt stetig zunimmt, ist weiterhin eine steigende Tendenz zu erwarten. In den USA sind mehr als 20 Millionen Menschen betroffen (15).

Bisher sind nur palliative Therapien gegen diese häufige Erkrankung bekannt. Die OA-Forschung ist deshalb unerlässlich, um wirkungsvolle präventive und therapeutische Strategien zu entwickeln.

1.2.1 DIE ÄTIOLOGIE DER OSTEOARTHROSE

Die Ätiologie der OA ist multifaktoriell bedingt und noch immer nicht ganz geklärt, kann aber grundsätzlich in drei Kategorien eingeteilt werden: mechanische Belastung, genetische Faktoren und altersbedingte Veränderungen.

1.2.1.1 MECHANISCHE BELASTUNG

Als mechanische Belastung kann entweder eine physiologische Belastung der abnormalen Knorpelstruktur oder eine abnormale Belastung der physiologischen Knorpelstruktur angesehen werden (16). Zu einer abnormalen Knorpelstruktur kann es neben dem Alterungsprozess auch durch genetische Faktoren kommen, die die Differenzierung oder die Funktion der Chondrozyten beeinflussen. Eine abnormale Belastung entsteht zum Beispiel durch Fehlstellung oder Trauma, hier können Chondrozyten direkt über mechanische Rezeptoren reagieren, indem sie die Syntheseaktivität oder die Produktion inflammatorischer Zytokine steigern (17, 18).

Durch mechanische Belastung wird die Zell-Matrix-Interaktion gestört, so dass Fibrillationen, Zellcluster und Veränderungen in der Verteilung oder Zusammensetzung der Matrixproteine entstehen können (17, 19). Im Knochen zeigt sich die mechanische Belastung in einer Umstrukturierung der Orientierung von Mineralien und Kollagenen und in einer Ansammlung von mikroskopischen Rissen in der Knochenmatrix.

1.2.1.2 GENETISCHE FAKTOREN

Verschiedene Studien deuten auf genetische Abnormalitäten hin, die die Manifestation einer OA beschleunigen können (20). Vor allem Mutationen in Genen wie GDF5 oder COMP, die Komponenten der EZM kodieren, sind im Zusammenhang mit frühzeitig auftretender OA beschrieben (21, 22). Durch Genomanalysen konnten Polymorphismen oder Mutationen in Genen aufgedeckt werden, die eine Prädisposition für OA bedingen könnten (23, 24). Des

Weiteren können genetisch bedingte Entwicklungsstörungen zu angeborenen Knorpeldysplasien führen.

Außerdem werden geschlechtsspezifische Unterschiede beobachtet was die Prävalenz und die klinische Manifestation der Erkrankung betrifft: vor einem Alter von 50 Jahren zeigt sich eine größere Prävalenz bei Männern. Nach der Menopause steigt aber das Auftreten von OA bei Frauen, welche dann meist mehrere Gelenke betrifft und schwerer verläuft (25-29). Man geht von einem chondroprotektiven Effekt der weiblichen Geschlechtshormone aus.

Auch in verschiedenen Maus-Stämmen wurden geschlechtsspezifische Unterschiede aufgezeigt: seit den fünfziger Jahren wird berichtet, dass männliche C57Bl/6-Mäuse für spontane OA anfälliger sind als weibliche (30-32). Auch bei einer enzymatisch induzierten OA bei C57Bl/10-Mäusen durch Kollagenase-Injektion entwickeln männliche Tiere mehr OA als weibliche (33). Der gleiche Effekt zeigt sich bei einer chirurgisch induzierten OA in verschiedenen Maus-Stämmen, bei der eine Destabilisierung des medialen Meniskus erfolgt (DMM, siehe 1.2.4.3) (34).

1.2.1.3 ALTERSBEDINGTE VERÄNDERUNGEN

Im Alter können verschiedene Veränderungen im artikulären Knorpel beobachtet werden: die Oberfläche wird weicher, die Zugfestigkeit nimmt ab und die Matrix versteift. Diese Veränderungen in der Zusammensetzung und Struktur der Knorpelmatrix sind zwar unabdingbar und der primäre Faktor für die Entstehung einer OA, bringen die Erkrankung aber nicht zwangsläufig mit sich (35).

Von den altersbedingten Veränderungen des muskuloskelettalen Systems sind vor allem der subchondrale Knochen, Muskeln, Synovium, Ligamente, Sehnen und Menisken betroffen (36). Außerdem kommt es während des Alterungsprozesses im artikulären Knorpel zu einem Verlust der Regenerationsfähigkeit der EZM durch die Chondrozyten, die bei physiologischer Belastung, wenn auch begrenzt, noch vorhanden ist. Dies ist vor allem auf eine verminderte anabolische Aktivität der Zellen zurückzuführen, die mit der Telomerverkürzung im Alter zusammenhängt (37). Auch Sauerstoffradikale, DNA-Schäden und mitochondriale Funktionsstörungen spielen hier eine Rolle (38).

1.2.2 DIE PATHOGENESE DER OSTEOARTHROSE

Am Krankheitsverlauf der OA sind viele Faktoren und Gewebe beteiligt. So werden die Chondrozyten als zellulärer Mediator der OA-Pathogenese gesehen, aber auch Veränderungen im subchondralen Knochen und Inflamationsprozesse spielen eine Rolle.

Deshalb soll die Pathogenese der OA hier aus den verschiedenen Gesichtspunkten dargestellt werden.

1.2.2.1 CHONDROZYTEN

Chondrozyten stellen den einzigen Zelltyp in der adulten Knorpelmatrix dar. Aufgrund der hypoxischen Bedingungen und der avaskulären Umgebung ist ihre Stoffwechselaktivität und ihr Regenerationspotential gering. In einem gesunden Gelenk können Matrix-Proteine wie Kollagen eine Halbwertszeit von über 100 Jahren aufweisen (39). Die Halbwertszeit von Aggrecan wird auf etwa 3-24 Jahre geschätzt (40).

Im Initialstadium der OA zeigen Chondrozyten eine erhöhte Zellproliferation und eine gesteigerte Syntheseaktivität, um die geschädigte Matrix zu regenerieren. Vor allem knorpelspezifische Komponenten wie Typ-II, -IX und -XI Kollagen, Aggrecan und perizelluläres Typ-VI Kollagen werden vermehrt gebildet, um die Matrixdegeneration zu kompensieren (4, 41). Auch Typ-I und Typ-III Kollagen, die als Reparatur-Kollagene gelten und normalerweise nicht im Knorpel zu finden sind, können detektiert werden (42-45). Auch Matrixverlust, Zell-Cluster und Veränderungen in Anzahl, Verteilung und Zusammensetzung der Matrixproteine zeigen Unterschiede zum physiologischen Aufbau des artikulären Knorpels (46). Des Weiteren kann in osteoarthrotischem Knorpel Typ-X Kollagen nachgewiesen werden, das als Hypertrophie-Marker für Chondrozyten gilt, die dann apoptotisch werden (47, 48).

Die Regenerationsfähigkeit der Chondrozyten kann im Initialstadium der OA zeitweise eine funktionelle artikuläre Oberfläche aufrechterhalten, ist aber limitiert, so dass im weiteren Verlauf der OA die Degradation des artikulären Knorpels überwiegt.

1.2.2.2 INFLAMMATION

OA zählt nicht zu den klassischen entzündlichen Arthropathien, da keine Neutrophile in der Synovialflüssigkeit zu finden sind und die Erkrankung sich nicht systemisch ausbreitet. Trotzdem sind bei OA lokal typische Entzündungssymptome zu beobachten, wie Schmerzen, Schwellung und Versteifung, bis hin zu funktionellen Einschränkungen und Behinderungen (14). Außerdem ist während der frühen und späten Phase der OA eine Synovitis mit Infiltration aktivierter B- und T-Lymphozyten und Überexpression proinflammatorischer Mediatoren zu beobachten (49). Eine solche Entzündung kann die Aktivitäten der Chondrozyten beim Regenerieren der EZM beeinflussen (50). Auch wenn der Mechanismus, durch den die Produktion der inflammatorischen Mediatoren initiiert wird, unklar ist, weiß man, dass Chondrozyten nicht nur auf Zytokine und Chemokine reagieren können, sondern dass sie auch in der Lage sind, proinflammatorische Mediatoren wie IL-1 β (Interleukin-1 β)

und TNF- α (Tumor Nekrosis Faktor α) selbst zu synthetisieren. Diese Entzündungsmediatoren führen in Chondrozyten zu einer gesteigerten Synthese von Proteinasen, Prostaglandinen und Stickoxid (NO) (50). Vor allem die Bildung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Aggrecanasen ist dann für den Proteoglykan- und Typ-II Kollagen-Verlust verantwortlich, der an der Knorpeloberfläche zu beobachten ist und zu immer größer werdenden Läsionen führt (51-53).

1.2.2.3 SUBCHONDRALER KNOCHEN

Aufgrund der direkten Angrenzung zum artikulären Knorpel spielt auch der subchondrale Knochen eine wichtige Rolle im humanen Knorpelstoffwechsel. Er ist im Verlauf einer OA ebenfalls von Veränderungen betroffen. Dazu gehören mikroskopisch kleine Risse, Ödeme oder Blutungen in der subchondralen Region, auch subchondrale Knochenzysten können sich entwickeln (54, 55). Im Initialstadium einer experimentell induzierten OA in Mäusen zeigte sich eine Verschmälerung der SKP (56). Das Endstadium der OA ist hingegen durch eine sklerosierte und verdickte SKP gekennzeichnet (56-58). Es ist nicht geklärt, welche Veränderungen zuerst auftreten: die am subchondralen Knochen oder die im artikulären Knorpel.

1.2.3 OSTEOARTHROSE IM MAUSMODELL

Da bis heute nur palliative Therapien zur Behandlung der OA bekannt sind, ist die OA-Forschung unerlässlich, um wirkungsvolle präventive und therapeutische Strategien gegen diese weltweit verbreitete Erkrankung zu entwickeln.

Dass bei der OA die verschiedensten Gewebetypen beteiligt sind (Knorpel, Knochen, Synovium) erschwert die Bedingungen für isolierte *in vitro*-Versuche. Die Erkrankung kann nur im intakten Organismus von Wirbeltieren reproduziert werden. Gerade bei einer komplexen und multifaktoriellen Erkrankung wie der OA liefern deshalb Tierversuche wichtige Hinweise auf die Mechanismen der Entstehung einer OA, aus denen biologische Marker für Diagnose und Prognose der Erkrankung und therapeutische Ziele entwickelt werden können, sowohl für die Human- als auch für die Tiermedizin.

Eine bevorzugte Spezies für Tierversuche stellt die Maus dar. Bei ihr kann aufgrund von genetischen Modifikationen (die auch genetische Deletionen und Überexpressionen beinhalten) die *in vivo*-Signifikanz bestimmter Schlüsselgene am einfachsten charakterisiert werden.

Um die OA im Tiermodell zu untersuchen sind zum Beispiel Tierarten geeignet, in denen sich eine natürlich entwickelnde OA spontan manifestiert. Dazu gehören Mäuse, Meerschweinchen und Makaken, aber auch bestimmte Hunderassen wie der Labrador, der Deutsche Schäferhund und der Beagle (59-63). Bei Mäusen variiert die Inzidenz der Erkrankung mit Stamm und Geschlecht, kann aber bei alten Mäusen bis zu 90 % betragen. Die spontane OA zeichnet sich vor allem durch vermehrten Proteoglykanverlust und Knorpeldegradation aus (64). Der Nachteil bei der Evaluierung spontaner OA ist die Dauer der Entstehung: bei Wildtyp-Mäusen zeigen sich erste Anzeichen im Alter von 9-12 Monaten (65).

Um die Entwicklung einer OA im Tiermodell zu beschleunigen, kann eine experimentelle OA durch enzymatische oder chemische Methoden induziert werden, indem schädigende Enzyme oder Substanzen intraartikulär injiziert werden (65-67).

Eine weitere Form zur Induktion der OA stellen chirurgische Methoden dar. Sie sind im Tiermodell die gebräuchlichste Methode, auch wenn nicht klar ist, wie sehr die so hervorgerufene OA mit der idiopathischen OA der älteren humanen Bevölkerung vergleichbar ist. Von Vorteil sind hier aber ein schnell eintretender Krankheitsbeginn, verminderte Variabilität und weniger Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund. Ursprünglich wurden diese Modelle bei Hunden, Meerschweinchen, Kaninchen, Ratten, Schafen und Ziegen angewendet. Wegen den hohen Kosten, die die Unterbringung größerer Tiere erfordert, und wegen ihrem hohen Arzneimittelverbrauch werden kleinere Tiere für derartige Untersuchungen bevorzugt. Inzwischen sind auch chirurgische Methoden zur Induktion einer OA bei Mäusen gebräuchlich. In Glasson *et al.* (2007) werden zwei häufig angewendete Methoden vergleichend dargestellt: die Destabilisierung des medialen Meniskus und die Inzision des vorderen Kreuzbandes (68).

Die Destabilisierung des medialen Meniskus (DMM) ist einfach durchzuführen und sehr gut reproduzierbar. Sie löst ein langsames Fortschreiten der Erkrankung aus, so dass dieses Modell eine milde bis moderate OA hervorruft, deren Effekte mit denen der spontanen OA vergleichbar sind (64). Außerdem werden sie nicht, wie in anderen Modellen beschrieben, durch große biomechanische Schäden überlagert. Dieses Modell wird deshalb von Glasson *et al.* als Methode der Wahl beschrieben, um eine spontane OA zu imitieren und das Fortschreiten einer OA bei Mäusen vergleichend histologisch darzustellen (68).

1.3 DAS MELANOCORTINSYSTEM

Das Melanocortinsystem besteht aus den Melanocortinen (MCs), den Melanocortin-Rezeptoren (MC-Rs), den Melanocortin-Antagonisten (Agouti und Agouti-related protein: AGRP) und zwei zusätzlichen Proteinen (Mahogany und Syndecan-3), die die Aktivität der MCs beeinflussen können.

1.3.1 DIE MELANOCORTINE

Melanocortine sind Peptide, die alle von dem gemeinsamen Vorläuferprotein Proopiomelanocortin (POMC) abstammen (Abb. 1.2). Obwohl POMC ursprünglich nur als Neurohormon bekannt war, das in der Hypophyse produziert wird, weiß man inzwischen, dass es auch in den meisten peripheren Geweben exprimiert werden kann (Haut, Plazenta, Geschlechtsorgane, Schilddrüse, Pankreas, u.a.) (69).

Zu den MCs zählen α -, β - und γ -Melanozyten-stimulierendes Hormon (MSH), Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) und β -Endorphin, wobei letzteres trotz des gemeinsamen Vorläufermoleküls den endogenen Opioiden zuzuordnen ist. Sie entstehen durch posttranslationale Spaltung von POMC durch Prohormon-Convertasen (PCs) (sh Abb. 2) und zeichnen sich durch eine gemeinsame Aminosäuresequenz aus (His-Phe-Arg-Trp), die als Schlüssel-Pharmakophor für die biologische Aktivität dient (70).

MCs spielen eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen Prozessen wie Energiehaushalt, Thermoregulation, Nozizeption und Pigmentierung. Außerdem konnte den MCs bereits *in vitro* und *in vivo* anti-inflammatorisches und zytoprotektives Potential nachgewiesen werden (71). Vor allem α -MSH gilt als anti-inflammatorisch wirkendes Peptid, das zur Behandlung humaner inflammatorischer Erkrankungen bereits in die klinische Praxis Einzug genommen hat (72-74).

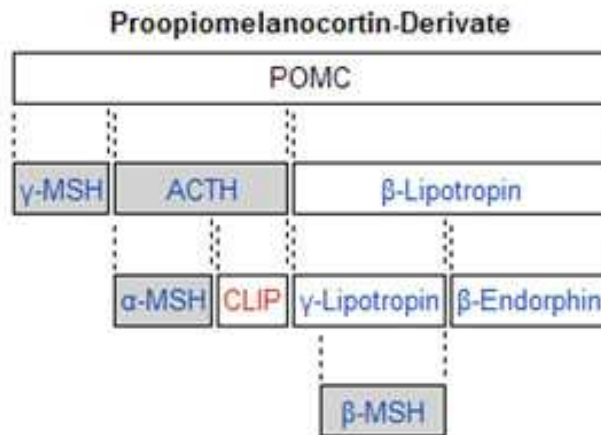


Abb. 1.2: Synthese der Proopiomelanocortin-Derivate aus Böhm et al., 2006 (75).

1.3.2 DIE MELANOCORTIN-REZEPTOREN

Die MCs ACTH, α -, β - und γ -MSH binden mit hoher Affinität an Melanocortin-Rezeptoren (MC-Rs), während β -Endorphin eine Ausnahme bildet und an Opioid-Rezeptoren (ORs) bindet. Die MC-Rs gehören der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen an (76). Bei allen MC-Rs wird durch Stimulation der Adenylat-Cyclase ein intrazellulärer Anstieg von cAMP hervorgerufen. Abhängig vom Zelltyp kann die Signaltransduktion aber auch über andere Kaskaden vermittelt werden. Je nach Subtyp werden die MC-Rs in einer Vielzahl von Geweben exprimiert (71).

Es sind fünf MC-Rs bekannt (MC-1R bis MC-5R), die untereinander eine Aminosäuresequenz-Homologie von 39-61 % aufweisen. Sie binden die MCs mit unterschiedlicher Affinität (Tab. 1.1).

Rezeptor	Agonisten in absteigender Affinität
MC-1R	α -MSH > ACTH >> γ -MSH
MC-2R	ACTH
MC-3R	γ -MSH = ACTH \geq α -MSH
MC-4R	α -MSH = ACTH >> γ -MSH
MC-5R	α -MSH \geq ACTH > γ -MSH

Tab. 1.1: Bindungsaffinitäten der Melanocortine an ihre Rezeptoren (3).

α -MSH gilt als bevorzugter Ligand für MC-1R und MC-5R. Sein anti-inflammatorisches und zytoprotektives Potential wird aber vor allem durch das Zusammenspiel mit dem MC-1R vermittelt (71).

1.3.3 MELANOCORTINE IM OSTEOARTIKULÄREN SYSTEM

1.3.3.1 SYNOVIALGEWEBE

Bereits 1986 wurde über POMC-Derivate in der Synovialflüssigkeit berichtet: bei der Untersuchung der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Arthropathien wie Rheumatoider Arthritis (RA) und OA wurden vor allem in RA-Patienten erhöhte β -Endorphin-Spiegel gemessen (77, 78). Auch α -MSH konnte in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA, OA oder Juveniler chronischer Arthritis nachgewiesen werden (79). Die Hinweise verdichten sich, dass das Synovium selbst in der Lage ist, POMC-Derivate zu synthetisieren und diese dann in die Synovialflüssigkeit zu entlassen, vor allem als Reaktion auf Stress und inflammatorische Signale. Um dies zu bestätigen, werden weitere *in vitro*-Studien benötigt, die klären können, in welchem Ausmaß und durch welche spezifische Stimuli verschiedene Zelltypen zu einem autonomen POMC-System im osteoartikulären System beitragen.

Auch Rezeptoren für POMC-Derivate werden von verschiedenen Zelltypen des Synovialgewebes exprimiert. In Synovialzellen aus RA-Patienten konnten Rezeptoren für β -Endorphin nachgewiesen werden (80).

1.3.3.2 KNORPELGEWEBE

In humanen artikulären Chondrozyten aus Patienten im Endstadium einer OA konnten trunkierte POMC-Transkripte detektiert werden, allerdings keine funktionsfähigen POMC-Derivate (81, 82). Man weiß aber, dass Chondrozyten ein direktes Ziel für POMC-Derivate darstellen: in der Ratte konnte eine spezifische Bindung von β -Endorphin an Chondrozyten im artikulären Knorpel und in der Wachstumsfuge nachgewiesen werden (83, 84). Auch im caninen Gelenk mit experimentell induzierter Arthritis konnte intra- und periartikulär eine Opioid-Bindung nachgewiesen werden (85). In humanen artikulären Chondrozyten wurde die Expression des OR bestätigt, die *in vitro*-Stimulation dieser Zellen mit β -Endorphin rief eine Zellantwort hervor (86).

Auch die Transkripte von MC-1R, MC-2R und MC-5R konnten in humanen artikulären Chondrozyten aus OA-Patienten nachgewiesen werden, der MC-1R wurde auch auf Proteinebene detektiert (82). Außerdem rief die Stimulation dieser Zellen mit α -MSH eine

Zellantwort in Form eines cAMP-Anstiegs hervor, was dem typischen Signalweg der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren entspricht, zu denen auch die MC-Rs gehören (82).

In eigenen, bisher unveröffentlichten Studien wurden auch in murinen artikulären und kostalen Chondrozyten Transkripte von MC-1R, MC-2R, MC-4R und MC-5R, sowie POMC, detektiert.

1.3.3.3 KNOCHENGeweBE

Auch in Knochengewebe konnten verschiedene MC-Rs nachgewiesen werden. So wird in Ratten der MC-4R in Osteosarcoma-Zellen und auf primären Osteoblasten exprimiert. Auch MC-2R- und MC-5R-Transkripte konnten hier in primären Osteoblasten detektiert werden (87).

In murinem Knochengewebe wurden durch in situ Hybridisierung alle MC-Rs auf Chondrozyten der Epiphysenfuge nachgewiesen. Der MC-2R wurde außerdem auf Osteozyten und Osteoblasten exprimiert. Auch in einer murinen Osteoklasten-Zelllinie konnten alle MC-R-Subtypen detektiert werden (88).

Außerdem wurden in humanen Osteoblasten und bestimmten Osteosarcoma-Zelllinien Transkripte aller fünf Subtypen der MC-Rs gefunden (88).

1.3.4 EFFEKTE VON MELANOCORTINEN IM OSTEOARTIKULÄREN SYSTEM

Die oben genannten Beobachtungen lassen bereits direkten oder indirekten Einfluss des Melanocortinsystems auf das osteoartikuläre System und dessen Pathophysiologie vermuten. Bisher konnten bereits einige Effekte gezeigt werden, die im Folgenden aufgeführt werden.

1.3.4.1 ANTI-INFLAMMATION

Die Applikation von α -MSH bei Ratten mit einer experimentell induzierten Adjuvant-Arthritis hemmt die Entwicklung klinischer und histologischer Anzeichen der Krankheit und beugt dem damit assoziierten Gewichtsverlust vor (89). Auch bei Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis werden die Symptome durch Applikation von α -MSH vermindert (90).

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass γ -MSH bei Serum-induzierter Arthritis in Mäusen und β -Endorphin bei Kollagen-induzierter Arthritis in Ratten den Grad der Erkrankung histologisch bzw. klinisch vermindern (91, 92).

ACTH ist in der Lage in Gichtarthritis bei Ratten sowohl die Konzentration von IL-1 β und IL-6 als typische Entzündungsmediatoren zu senken als auch die Akkumulation der Neutrophilen

und die Schwellung der betroffenen Gelenke zu reduzieren (93). Außerdem kann es steroid-induzierte Femurkopf-Nekrosen vermindern (94).

1.3.4.2 LÄNGENWACHSTUM UND KNOCHENVOLUMEN

Es konnte gezeigt werden, dass γ -MSH in Mäusen zu vermehrtem Längenwachstum der Tibia und zu einer Steigerung der hypertrophen Differenzierung und des Umsatzes in der Wachstumsfuge führen kann (95). Auch α -MSH kann Einfluss auf Umfang und Länge der murinen Tibia nehmen (96).

1.3.5 DIE MC-1R-SIGNALDEFIZIENTE MAUS

Bis vor kurzem war nichts über das mögliche Potential von MCs und MC-Rs bei degenerativen Arthropathien wie OA bekannt. Die oben aufgeführten Studien lassen aber darauf schließen, dass die Entstehung und das Fortschreiten einer OA vor allem über α -MSH und MC-1R vermittelte Signalwege beeinflusst werden kann.

Ein ideales Modell zur Untersuchung der Rolle von α -MSH und MC-1R im artikulären Knorpel und bei der Entwicklung einer OA stellt die MC-1Re/e-Maus (Mc1r) dar.

Die Mc1r-Mäuse haben den genetischen Hintergrund der C57Bl/6-Mäuse, welche somit den Wildtyp (WT) bzw. die Kontrolle darstellen. Aufgrund einer spontanen Nukleotid-Deletion kommt es zu einer Rasterverschiebung in deren Genom, was wiederum zu einem verkürzten und signaldefizienten MC-1R führt (97).

Da α -MSH auch einen großen Einfluss auf die Pigmentierung hat, zeigen die Mc1r-Mäuse eine veränderte Fellfarbe im Vergleich zum WT. Für die Pigmentierung in Säugetieren ist die Verteilung zweier Pigmente in Melanozyten verantwortlich: Eumelanin und Phaeomelanin. Viel Eumelanin ruft eine braun-schwarze Fellfarbe hervor, viel Phaeomelanin hingegen eine rot-gelbe (98, 99). Die Verteilung dieser Pigmente wird durch die Tyrosinase-Konzentration reguliert, eine hohe Tyrosinase-Konzentration führt zu vermehrter Bildung von Eumelanin, also zu braun-schwarzer Fellfarbe. Eine niedrige Tyrosinase-Konzentration hingegen zieht viel Phaeomelanin nach sich, ruft also eine rot-gelbe Fellfarbe hervor.

Da α -MSH über MC-1R die Transkription der Tyrosinase (100, 101) und die Tyrosinase-Aktivität (102, 103) steigert, wird im WT die Eumelanin-Bildung begünstigt, deshalb ist der Phänotyp des WT braun-schwarz (104).

Bei *Mc1r*-Mäusen kann α -MSH seine Wirkung über den MC-1R nicht vermitteln, wodurch die Konzentration der Tyrosinase gering ist und die Phaeomelanin-Konzentration überwiegt, was zu einem rot-gelben Phänotyp der *Mc1r*-Mäuse führt (Abb. 1.3).

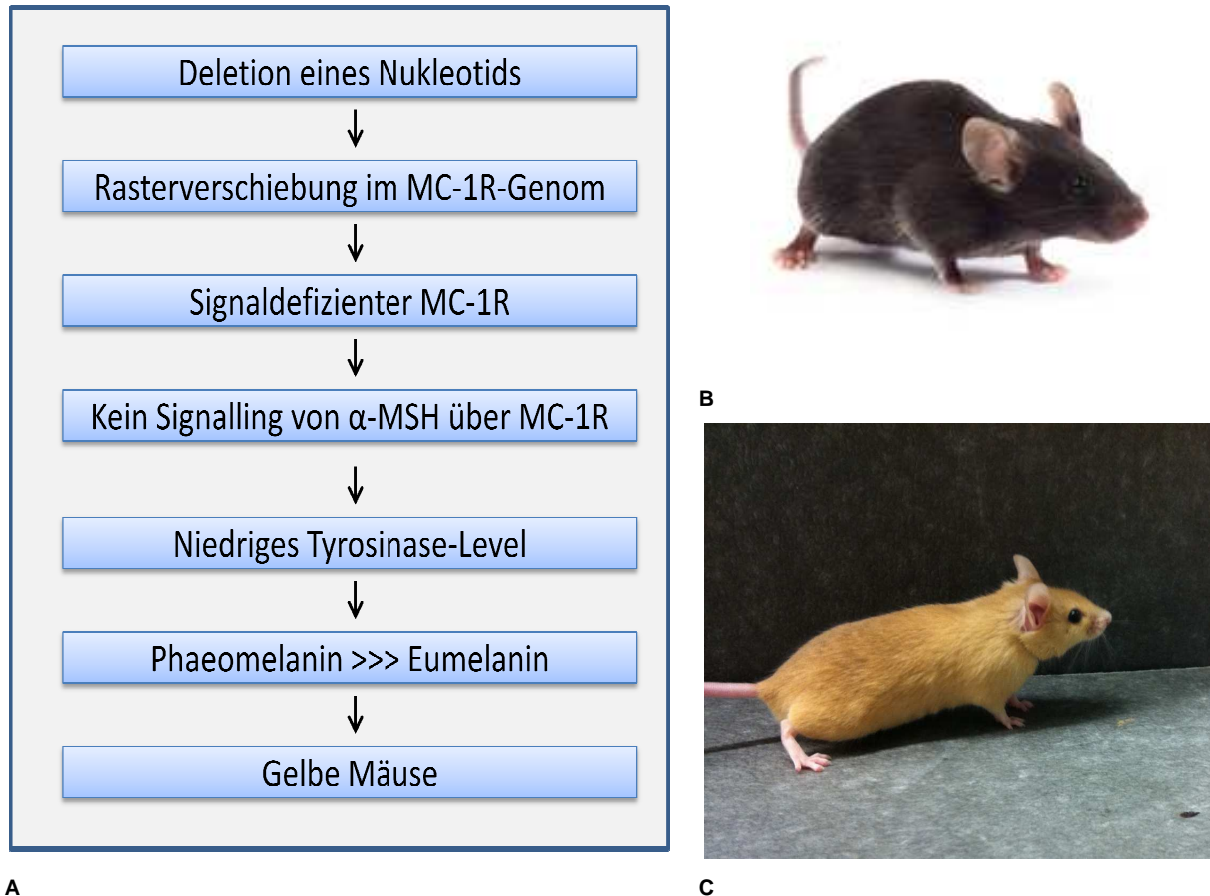


Abb. 1.3: **A)** Prinzip der veränderten Pigmentierung in *Mc1r*. **B)** C57Bl/6-Maus, WT (www.criver.com). **C)** *Mc1r*^{Re/e}-Maus (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. med. Markus Böhm, Universitätsklinikum Münster; eigene Aufnahme).

Aufgrund des signaldefizienten MC-1R stellen diese Mäuse ein ideales Modell dar, um den Einfluss des MC-1R-Signalwegs auf das osteoartikuläre System und auf degenerative Arthropathien wie OA *in vivo* zu untersuchen.

2. ZIEL DER ARBEIT

Ziel der Arbeit war es, die Rolle des Melanocortinsystems im Verlauf einer OA *in vivo* zu bestimmen. Dafür sollten gesunde und osteoarthrotische Kniegelenke signaldefizienter MC-1R-Mäuse charakterisiert werden. Sowohl der artikuläre Knorpel als auch die SKP wurden in die Untersuchungen miteinbezogen. Des Weiteren wurden die geschlechtsspezifischen Unterschiede, die sich während einer OA entwickeln, betrachtet.

Um den Verlauf einer OA in Mc1r-Mäusen zu charakterisieren, wurde ein chirurgisch induziertes OA-Modell im murinen Kniegelenk etabliert: die Destabilisierung des medialen Meniskus (DMM) durch Inzision des medialen meniskotibialen Ligaments (MMTL). Die Kniegelenke wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der OA (4, 6 und 8 Wochen) entnommen, um osteoarthrotische Veränderungen einer OA im Zeitverlauf darzustellen.

Gesunde und osteoarthrotische Kniegelenke von Mc1r- und WT-Mäusen wurden histologisch evaluiert. Nach Safranin O/Fast Green-Färbung wurden artikuläre Knorpelschäden wie Proteoglykan- und Chondrozytenverlust durch ein histologisches Scoring und durch eine morphometrische Auswertung analysiert. Veränderungen der Dicke der SKP wurden durch eine morphometrische Auswertung bestimmt.

Das Projekt wurde von der DFG (Az GR 1301/9-1 als TP der FOR 696) gefördert und das Versuchsvorhaben wurde am 26.04.2012 nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durch die Regierung der Oberpfalz (Antrag 54-2532.1-36/11) genehmigt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 VERBRAUCHSARTIKEL

Artikel	Firma
Antibody Diluent	Dako
Applikator für Michelklammern, 11 mm	Fine Science Tools Inc.
Dako ARK	Dako
Deckgläschen, 25x50 mm	engelbrecht medizin- und labortechnik GmbH
Einbettformen aus Metall	Carl Roth
Einbettkassetten Rotilabo® 40x28x6.8 mm	Carl Roth
Einmal Insulinspritze U100, 0.3 ml	Becton Dickinson GmbH
Einmalspritzen steril, 1 ml	Becton Dickinson GmbH
Einmalröhrchen 15/50 ml	Becton Dickinson GmbH
Fettstift (Dako Pen)	Dako
Injektionskanülen (0.55x25; 0.45x13)	Becton Dickinson GmbH
Michelklammern, 1.75x7.5 mm	Fine Science Tools Inc
Nahtmaterial (Vicryl 8-0, resorbierbar)	Ethicon GmbH
Objektträger, Superfrost Plus	Menzelgläser
Ohrmarken und Zange	Hauptner
Operationsbesteck (Mouse Dissecting Kit)	World Precision Instruments
Pipetten 5/10/25/50 ml	Corning Inc.
Pipettenspitzen 10/100/1000 µl	Eppendorf AG
Reaktionsgefäße 0.5/1.5/2.0 ml	Eppendorf AG

3.1.2 CHEMIKALIEN, REAGENZIEN UND LÖSUNGSMITTEL

Artikel	Firma
2-Propanol	Merck
Augen- und Nasensalbe Bepanthen®	Bayer Vital GmbH
Eisen-III-Chlorid	Sigma-Aldrich
Essigsäure	AppliChem
Ethanol (EtOH) 100%	Merck
Fast Green	AppliChem
H ₂ O ₂	Carl Roth
Hämatoxylin	AppliChem
HCl conc. 37%	AppliChem
NaCl-Lösung steril, 0.9 %	Braun
NaOH 32 %	Carl Roth
Paraplast	Surgipath
PBS 1x, steril	Sigma
Roti®-Histol	Carl Roth
Roti®-Histokitt	Carl Roth
Safranin O	AppliChem

3.1.3 ANTIKÖRPER UND ENZYME

Artikel	Firma
Typ-II Kollagen-Antikörper (CIICl), murin, 10 µg/ml	DSHB
Protease XXIV P8038	Sigma-Aldrich
Hyaluronidase H3506	Sigma-Aldrich

3.1.4 ANÄSTHETIKA UND ANALGETIKA

Artikel	Firma
Xylazin 2 %, Injektionslösung für Tiere	Serumwerk Bernburg AG
Ketamin 10 %, Injektionslösung	Bela-Pharma
Buprenorphin 0.3 mg/ml, Injektionslösung	Bayer-Vital GmbH

3.1.5 GERÄTE

Artikel	Firma
Stereomikroskop, Modell 33213	Eschenbach Optik GmbH
Einbettstation	Leica Biosystems
Gefrierblock	Leica Biosystems
Grafiktablett <i>bamboo</i>	Wacom
Mikrotom	Leica Biosystems
Wärmeschrank 37 °C	Memmert GmbH + Co. KG
Wärmeschrank 60°C	Binder GmbH
Wasserbad	MEDITE GmbH

3.1.6 LÖSUNGEN

Acid Alcohol:

10 ml	HCl conc. 32 %
Ad. 900 ml	EtOH 70%

Acetic Acid 1 %:

10 ml	Essigsäure 100%
Ad. 1000 ml	Aqua bidest.

Ethylendiamintetraessigsäure 20 % (EDTA):

200 g	Ethylendiamintetraessigsäure > 99 % p.A.
200 ml	Aqua bidest. Rühren, bei 60-65 °C + NaOH 32 %, bis die Lösung klar ist auf pH 7,4 einstellen
Ad. 1000 ml	Aqua bidest.

Fast Green 0,02 %:

0,140 g	Fast Green
700 ml	Aqua bidest. In lichtundurchlässiger Flasche aufbewahren

Paraformaldehyd 4 % (PFA):

40 g	Paraformaldehyd
1000 ml	PBS 1x, steril Rühren, bei 60-65 °C + NaOH 32 %, bis die Lösung klar ist auf pH 7,4 einstellen

Safranin O 0,1 %:

0,7 g	Safranin O
700 ml	Aqua bidest. In lichtundurchlässiger Flasche aufbewahren

Weigert's Eisen-Hämatoxylin:

Lösung A:

3,5 g	Hämatoxylin
350 ml	EtOH 96 % erwärmen und auflösen

Lösung B:

5,25 g	Eisen-III-Chlorid
350 ml	Aqua bidest.
3,5 ml	HCl conc. 32 %

Unmittelbar vor Gebrauch: Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:1 mischen

3.1.7 VERSUCHSTIERE UND TIERHALTUNG

Das Versuchsvorhaben wurde am 26.04.2012 nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durch die Regierung der Oberpfalz (Antrag 54-2532.1-36/11) genehmigt.

Für die Durchführung der Versuche wurden insgesamt 18 männliche und 18 weibliche C57Bl/6J-Mäuse (WT) und 18 männliche und 18 weibliche MC-1Re/e-Mäuse (Mc1r) verwendet. Die WT-Mäuse wurden von der Versuchstierzucht Charles River, Sulzfeld, Deutschland geliefert, die Mc1r-Mäuse stammten aus Eigenzucht, wobei die Zuchtpärchen von Herrn Prof. Dr. med. Markus Böhm, Lehrstuhl für Dermatologie und Venerologie, Universitätsklinikum Münster, zur Verfügung gestellt wurden.

Die Zucht und Unterbringung der Mäuse erfolgte im Tierlabor H4 der medizinischen Fakultät der Universität Regensburg unter Leitung von Tierpflegemeister Engelbert Meier. Während die Mc1r-Mäuse bereits dort geboren wurden, wurden die WT-Mäuse zur Adaptation an die Umgebungsbedingungen bereits 14 Tage vor Versuchsbeginn dorthin verbracht. Der Zutritt erfolgte mit einfachen Hygienemaßnahmen nach einer Einweisung durch das Tierpflegepersonal. Ansonsten gelten für das Tierlabor H4 folgende Daten (sh. auch www.uni-regensburg.de/forschung/zentrale-tierlaboratorien/index.html):

Gehaltene Spezies:

Im Tierlabor gehaltene Spezies sind Maus, Ratte, Gerbil und Kaninchen.

Haltung:

Das Tierlabor H4 ist eine konventionelle Tierhaltung. Der Zugang erfolgt durch eine einfache Schleuse, in der Schutzkleidung (Einmalüberziehschuhe, Schutzmantel und Einmalhandschuhe) angelegt wird. Mitgebrachtes Arbeitsmateriel muss sauber und frei von unerwünschten Pathogenen sein.

Im Tierlabor H4 befinden sich acht Tierräume, ein Eingriffsraum mit Abluft und ein Arbeitsflur.

Klimatisierung:

Die Raumtemperatur beträgt $21\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ bei einer Luftfeuchtigkeit von $55\% \pm 10\%$ und 16 Luftwechsel pro Stunde. Die Zuluft erfolgt durch einen Schwebstofffilter.

Versorgung:

Die Tiere werden *ad libitum* mit Wasser aus Tränkeflaschen und Futter (Ssniff bzw. Baywa) versorgt. Mäuse werden in Käfigen mit Gitterdeckel Typ II oder III auf Einstreu „Weichholzfaser“ Typ ¾ (Altromin) gehalten. Ein Käfigwechsel wird nach Bedarf, mindestens aber einmal pro Woche durchgeführt.

Gesundheitsüberwachung (Healthmonitoring):

Im Tierlabor befinden sich Bestands-Sentinels, die Gesundheitsüberwachung findet einmal pro Jahr statt. Hier werden serologische Tests durch Biodoc, Hannover und mikrobiologische Tests im Haus (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene) durchgeführt.

3.1.8 SOFTWARE UND INTERNETDIENSTE

Die Nachbearbeitung der mikroskopischen Bilder erfolgte mit Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Inc.), zur Flächenvermessung wurde Image J (National Institute of Health) eingesetzt. Für die statistischen Analysen und die Erstellung der Graphiken wurde GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc.) verwendet. Bei der Literaturrecherche half PubMed von NCBI (The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.2 METHODEN

3.2.1 CHIRURGISCHE INDUKTION EINER OSTEOARTHROSE

Die chirurgische Induktion der OA wurde durch eine Destabilisierung des medialen Meniskus (DMM) an der rechten Hintergliedmaße hervorgerufen (68). Bei dieser Methode wird das mediale meniskotibiale Ligament (MMTL), das den Meniskus kranial mit dem Tibiplateau verbindet, durchtrennt (Abb. 3.1). Das führt zu einer abnehmenden Kongruenz und einer verkleinerten Kontaktregion zwischen den artikulierenden Strukturen, so dass sich die Belastung im Gelenk auf eine kleinere Fläche verteilt, wodurch der lokale mechanische Stress erhöht wird.

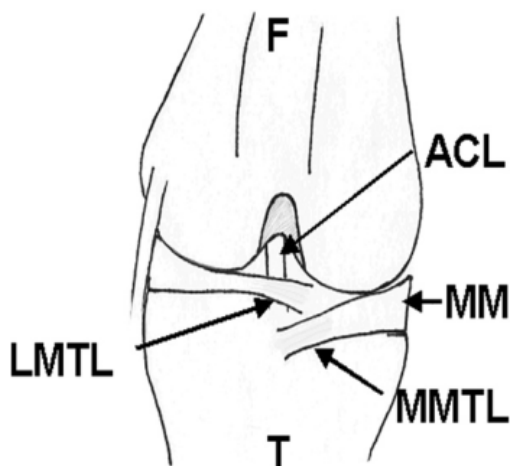


Abb. 3.1: Rechtes Kniegelenk einer Maus von kranial.
Zur Destabilisierung des medialen Meniskus und des Kniegelenks wird das MMTL durchtrennt. F = Femur, T = Tibia, ACL = anteriores Kreuzband, MM = medialer Meniskus, MMTL = mediales meniskotibiales Ligament, LMTL = laterales meniskotibiales Ligament (Abb. aus Glasson et al., 2007) (68).

Der chirurgische Eingriff erfolgte im Alter von 10 Wochen, da bei Mäusen hier bereits das Längenwachstum der Röhrenknochen abgeschlossen ist (65). Die Tiere (Mc1r und WT) wurden intraperitoneal mit Xylazin (6-8 mg/kg Körpergewicht = KGW) und Ketamin (90-120 mg/kg KGW) anästhesiert und erhielten Augensalbe lokal und NaCl-Infusion subkutan (10 ml/kg KGW). Nach Desinfektion des OP-Bereichs und der Hintergliedmaßen mit EtOH 70% wurde die Haut unter mikroskopischer Kontrolle mit einem ca. 3 mm langen longitudinalen Schnitt von der distalen Patella zum proximalen Tibia-Plateau eröffnet. Direkt medial der Patellarsehne erfolgte die Inzision und das Eröffnen der Gelenkkapsel mit der Mikro-Iris-Schere. Durch eine Pinzette wurde das Fettgewebe am kranialen Rand des medialen Meniskus entfernt. Nach Darstellen der intercondylären Region, des vorderen Kreuzbandes und des medialen meniskotibialen Ligaments wurde dieses Ligament mit der Mikro-Iris-Schere durchtrennt und der Meniskus vom Tibiaplateau abgehoben.

Die Gelenkkapsel wurde mit einer fortlaufenden Naht verschlossen, die Haut mit ein oder zwei Michelklammern.

12 h und 24 h nach der OP wurde das Befinden der Mäuse kontrolliert, sie erhielten eine weitere NaCl-Infusion subkutan und eine Analgesie mit Buprenorphin (0.09 mg/kg KGW) ebenfalls subkutan. Eine weitere Kontrolle des Allgemeinbefindens erfolgte 48 h nach der OP und von da an wöchentlich.

An der linken Hintergliedmaße wurde eine Sham-OP durchgeführt: nach Inzision der Haut und Eröffnen der Gelenkkapsel, wurden die intercondyläre Region, das vordere Kreuzband und das MMTL dargestellt, woraufhin die Wunde dann ohne Inzision des MMTL wie oben beschrieben geschlossen wurde.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden osteoarthrotische Kniegelenke von Mc1r-Mäusen mit denen von WT-Mäusen histologisch und morphometrisch ausgewertet und miteinander verglichen, um den Einfluss von α -MSH über MC-1R auf die Ausprägung der OA zu bestimmen.

Die Kniegelenke wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der OA entnommen (4, 6 und 8 Wochen). Pro Zeitpunkt wurden je 12 Mäuse (6 männliche und 6 weibliche) verwendet.

Die Gruppeneinteilung erfolgte also nach folgendem Schema (Tab. 3.1):

Tierstamm	Tierzahl	Eingriff Knie rechts im Alter von 10 Wochen	Eingriff Knie links im Alter von 10 Wochen	Zeitraum bis zur Knieentnahme
C57Bl/6J	12	DMM-OP	Sham-OP	4 Wochen
	12	DMM-OP	Sham-OP	6 Wochen
	12	DMM-OP	Sham-OP	8 Wochen
	gesamt: 36			
MC-1Re/e	12	DMM-OP	Sham-OP	4 Wochen
	12	DMM-OP	Sham-OP	6 Wochen
	12	DMM-OP	Sham-OP	8 Wochen
	gesamt: 36			

Tab. 3.1: Versuchsdesign

3.2.2 HISTOLOGISCHE UND IMMUNOHISTOCHEMISCHE METHODEN

3.2.2.1 PROBENAUFBEREITUNG FÜR DIE HISTOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN

Zu festgelegten Zeitpunkten nach den Eingriffen (4, 6 und 8 Wochen) wurden die Kniegelenke der Mäuse nach CO₂-Euthanasie von Haut und Muskeln befreit und nach Durchtrennen des Femurs und der Tibia entnommen. Die Präparate wurden dann 18-24 h für histologische Untersuchungen in 2 ml 4 %-igem PFA (pH 7,4) fixiert. Nach der Fixierung wurden die Kniegelenke 2 Wochen in jeweils ca. 8 ml 20 %-igem EDTA (pH 7,4) dekalzifiziert, wobei das EDTA alle 2 Tage erneuert wurde.

Im Anschluss an die Dekalzifizierung wurden die Kniegelenke nach folgendem Protokoll auf das Einbetten in Paraffin vorbereitet:

- 3x 30 min in PBS 1x waschen
- Aufsteigende Alkoholreihe zum Entwässern:
 - 2-3 h EtOH 50%
 - 2-3 h EtOH 70%
 - über Nacht EtOH 96%
 - 4 h EtOH 96%
 - 2-6 h 2-Propanol
 - 2-6 h 2-Propanol
- Überführen der Kniegelenke in beschriftete Einbettkassetten

- Durchtränken in Einbettmittel:
 - 24h bei 60° C 2-Propanol-Paraplast-Gemisch im Verhältnis 1:1
 - 12h bei 60° C Paraplast
 - 24h bei 60° C Paraplast

Beim darauffolgenden Einbetten wurden die Kniegelenke so orientiert, dass sie von frontal geschnitten werden konnten, um alle vier Quadranten des Kniegelenks darzustellen (medialer Femurkondylus, mediales Tibiaplateau, lateraler Femurkondylus, laterales Tibiaplateau). Die Präparate wurden in Einbettschälchen ausgegossen, aufgeblockt, und bei 4° C für 24 h ausgehärtet.

Nach dem Aushärten wurden die Kniegelenke von frontal in 5 µm dicke Schnitte mit einem Rotationsmikrotom geschnitten und in 50° C warmem Wasser auf die Objektträger aufgezogen. Die Trocknung erfolgte mindestens 2 Tage im Wärmeschrank bei 37° C.

3.2.2.2 SAFRANIN O/FAST GREEN-FÄRBUNG

Die Safranin O-Färbung ist eine histologische Standardfärbung zur selektiven Darstellung der Glykosaminoglykan-Seitenketten der Proteoglykane des Knorpelgewebes. Der kationische Farbstoff bindet an die reaktiven Carboxyl- und Sulfatgruppen der Glykosaminoglykane (GAGs), so dass eine Umsetzung des Farbstoffes mit den Polyanionen erfolgt und das Gewebe sich rot färbt. Die Farbintensität ist direkt proportional zum GAG-Gehalt des Gewebes. Da Aggrecan im artikulären Knorpel den Hauptbestandteil der Proteoglykane darstellt, kann die Farbintensität der Safranin O-Färbung auch als Aggrecan-Gehalt des Gewebes verstanden werden.

Zum Anfärben des Bindegewebes wurde Fast Green verwendet, als Kerngegenfärbung Weigert's Hämatoxylin.

Um den Grad der OA in jedem Kniegelenk histologisch zu bestimmen, wurden pro Präparat fünf Paraffinschnitte im Abstand von 80 µm mit Safranin O/Fast Green nach folgendem Protokoll angefärbt:

- Entparaffinieren und Rehydrieren der Präparate:
 - 5 min Roti®-Histol
 - 1 min Roti®-Histol
 - 1 min 2-Propanol
 - 1 min 2-Propanol
 - 1 min EtOH 95%
 - 1 min EtOH 95%
 - 1 min EtOH 80%
 - 1 min Wasser bidest.
- Anfärben der Präparate:
 - 6 min Weigert's Hämatoxylin-Lösung
 - 1x tauchen Wasser bidest.
 - 1x tauchen Acid Alcohol (0.5 %)
 - 5 min laufendes Leitungswasser
 - 4 min Fast Green
 - 3x tauchen Acetic Acid (1 %)
 - 6 min Safranin O (0.1 %)
- Dehydrieren der Präparate:
 - 10x tauchen EtOH 95%
 - 20x tauchen 2-Propanol
 - 1 min 2-Propanol
 - 1 min Roti®-Histol
 - 2 min Roti®-Histol
- Eindeckeln der Präparate mit Roti®-Histokitt
- Trocknen der Präparate über Nacht

3.2.2.3 TYP-II KOLLAGEN-FÄRBUNG

Zur immunohistochemischen Darstellung der Verteilung der Typ-II Kollagene in den murinen Kniegelenken wurde ein primärer muriner Typ-II Kollagen-Antikörper verwendet, der humanes und murines Typ-II Kollagen spezifisch bindet. Um unspezifische Wechselwirkungen des sekundären anti-Maus-Antikörpers mit Immunglobulinen (Igs) aus dem Gewebe zu verhindern, wird der primäre Antikörper mithilfe des Dako ARK™ Kit vor Zugabe zum Gewebe an den biotinylierten sekundären anti-Maus-Antikörper gebunden (Abb. 3.2, Step 1). Alle ungebundenen freien sekundären Antikörper werden durch eine Blockierlösung (Normal mouse serum Ig, Abb. 3.2, Step 2) gebunden. Dadurch wird deren potentielle Interaktion mit endogenen Igs im murinen Kniegelenk verhindert, da ihre

Bindestelle gegen Maus-Igs nun besetzt ist. Der primäre Antikörper, der jetzt biotinyliert vorliegt, wird auf das Kniegelenk gegeben, so dass er sich spezifisch an Typ-II Kollagen anlagern kann. Nach Zugabe von Streptavidin-Peroxidase, welche sich durch eine hohe Affinität von Streptavidin an Biotin auszeichnet, und DAB/Chromogen erfolgt eine Braunfärbung der Bereiche mit Typ-II Kollagen durch Oxidation des DAB/Chromogen durch die Peroxidase.

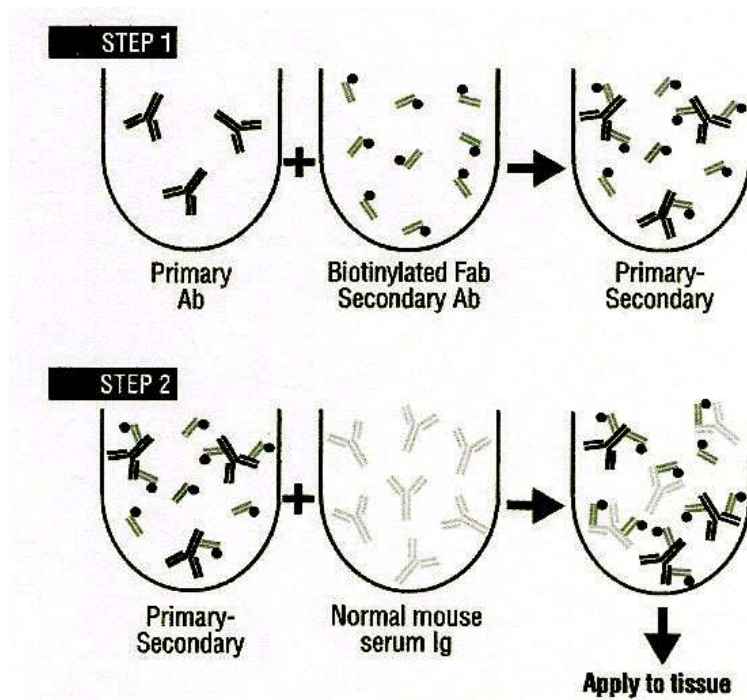


Abb. 3.2: Prinzip des Dako ARK™: **Schritt 1:** Biotinylierung des primären Antikörpers durch einen biotinylierten anti-Fab sekundären Antikörper. **Schritt 2:** Verhinderung der potentiellen Interaktion des sekundären Antikörpers mit unspezifischen endogenen Immunglobulinen durch Besetzen der Bindestellen mit Blockierlösung (Normal mouse serum Ig). Der primäre Antikörper, der nun biotinyliert vorliegt, kann im nächsten Schritt spezifisch an Typ-II Kollagen im Gewebe binden (aus Dako ARK™ Specification Sheet).

Die Typ-II Kollagen-Färbung wurde nach folgendem Protokoll in Anlehnung an die Vorgaben des Dako ARK™ durchgeführt:

- Entparaffinieren und Rehydrieren der Präparate:
 - 15 min Roti®-Histol
 - 15 min Roti®-Histol
 - 10 min 2-Propanol
 - 10 min EtOH 96 %
 - 10 min EtOH 90 %
 - 10 min EtOH 70 %
 - 10 min EtOH 50 %
 - 10 min Wasser bidest.
- Waschen und Demaskieren der Präparate:
 - 5 min PBS 1x
 - 5 min H₂O₂ 3 %
 - 3x5 min PBS 1x
 - 10 min Protease XXIV 0.05 % bei 37°C
 - 3x5 min PBS 1x
 - 90 min Hyaluronidase 0.1 % bei 37°C
 - 3x5 min PBS 1x
- Biotinylierung des primären Antikörpers:
 - Berechnung der benötigten Volumina für folgende Schritte siehe Dako ARK™ Specification Sheet
 - 15 min a) primärer Antikörper + sekundärer Antikörper + Dako Diluent
 - 15 min b) Zugabe von Blocking Reagent zu a)
- Inkubation der Präparate mit den Antikörpern:
 - 15 min biotinylierter primärer Antikörper
 - 3x5 min PBS 1x
 - 15 min Streptavidin-Peroxidase
 - 3x5 min PBS 1x
 - 5 ± 1 min DAB/Chromogen-Substrat
- Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin:
 - 6 min Weigert's Hämatoxylin-Lösung
 - 1x tauchen Wasser bidest.
 - 1x tauchen Acid Alcohol (0.5 %)
 - 5 min laufendes Leitungswasser

- Dehydrieren der Präparate:
 - 10 min EtOH 50 %
 - 10 min EtOH 70 %
 - 10 min EtOH 90 %
 - 10 min EtOH 96 %
 - 10 min 2-Propanol
 - 10 min Roti®-Histol
 - 10 min Roti®-Histol
- Eindeckeln der Präparate mit Roti®-Histokitt
- Trocknen der Präparate über Nacht

3.2.3 EVALUIERUNG DER OA

Alle histologisch gefärbten Präparate wurden in 40- und 100-facher Vergrößerung fotografiert. Die Evaluierung der OA erfolgte anhand der Veränderungen des artikulären Knorpels und der SKP nach Safranin O/Fast Green-Färbung an je fünf Schnitten pro Kniegelenk im Abstand von 80 µm. Sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen unterliegt der mediale Bereich verstärkt degenerativen Veränderungen (16, 105). Er dient außerdem als Zielregion der DMM, weshalb hier die größten Schäden zu erwarten sind. Deshalb wurden Veränderungen des artikulären Knorpels in den zwei medialen Quadranten des Kniegelenks (medialer Femurkondylus und mediales Tibiaplateau) beurteilt, Veränderungen der SKP wurden in der medialen Tibia analysiert.

3.2.3.1 EVALUIERUNG DES ARTIKULÄREN KNORPELS

Zur Beurteilung der Ausprägung der OA im artikulären Knorpel wurden zwei verschiedene Methoden verwendet: ein histologisches Scoring und eine morphometrische Auswertung .

Histologisches Scoring

Das Scoring zur histologischen Bestimmung der Ausprägung muriner OA erfolgte nach Anleitung von Glasson *et al.*, 2010 (10). Dieses System kann universell in unterschiedlich induzierten OA-Modellen angewendet werden und erlaubt eine objektive Evaluierung, die einfach anzuwenden und reproduzierbar ist. Das Scoring wurde nach folgendem Schema von Grad 0 (keine OA) bis Grad 6 (sehr starke OA) angewendet (Tab. 3.2):

Grad	Osteoarthrotischer Schaden
0	Normal
0.5	Leichter Safranin O-Verlust ohne strukturelle Veränderungen
1	Kleine Unebenheiten und Abschilferungen ohne Knorpelverlust
2	Vertikale Einrisse direkt unterhalb der oberflächlichen Knorpelschicht
3	Einrisse, Safranin O-Farbverlust und Zellverlust bei < 25 % der Knorpelfläche
4	Einrisse, Safranin O-Farbverlust und Zellverlust bei 25-50 % der Knorpelfläche
5	Einrisse, Safranin O-Farbverlust und Zellverlust bei 50-75 % der Knorpelfläche
6	Einrisse, Safranin O-Farbverlust und Zellverlust bei > 75 % der Knorpelfläche

Tab. 3.2: Histologisches Scoring nach Glasson et al., 2010 (modifiziert) (10).

Das histologische Scoring erfolgte pro Kniegelenk an fünf Paraffinschnitten im Abstand von 80 µm in den zwei medialen Quadranten des Kniegelenks (medialer Femurkondylus und mediales Tibiaplateau), so dass zehn Werte pro Kniegelenk zu einem Mittelwert zusammengefasst wurden.

Morphometrische Auswertung

Für die morphometrische Auswertung wurde das Grafiktablett *BAMBOO* von *Wacom* verwendet, das ein präzises und punktgenaues Zeichnen in digitalen Bildern erlaubt. Mit Hilfe dieses Tablett und dem Programm *Image J* wurde die zell- und farblose Knorpelregion, die bei einer OA entsteht, und der gesamte Knorpel umrandet und deren Fläche in Pixel angezeigt. Daraus wurde der prozentuale Anteil der geschädigten Knorpelfläche in Bezug auf die Gesamtknorpelfläche bestimmt.

Die morphometrische Auswertung erfolgte ebenfalls bei männlichen und weiblichen Mäusen pro Kniegelenk an fünf Paraffinschnitten im Abstand von 80 µm in den zwei medialen Quadranten. Die daraus resultierenden zehn Werte pro Kniegelenk wurden für jedes Kniegelenk zu einem Mittelwert zusammengefasst.

3.2.3.2 EVALUIERUNG DER SKP

Die Veränderungen der SKP wurden jeweils im tibialen medialen Quadranten männlicher Mäuse beurteilt. Mit Hilfe des Grafiktablett *BAMBOO* und dem Programm *Image J* wurde, wie bei der morphometrischen Auswertung des artikulären Knorpels beschrieben, die Fläche der tibialen SKP in Pixel bestimmt. Die fünf daraus resultierenden Werte wurden pro Kniegelenk zu einem Mittelwert zusammengefasst.

3.2.3.3 STATISTIK

Die statistischen Analysen und die Erstellung der Graphiken erfolgte mit GraphPad Prism 4. Zum Vergleich von je zwei Gruppen wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test (MWU-Test) verwendet.

Pro Kniegelenk ergibt sich sowohl im histologischen Scoring als auch in der morphometrischen Auswertung des artikulären Knorpels bzw. der SKP ein Mittelwert für den Grad der Ausprägung der OA. In der statistischen Analyse wurden immer die Mittelwerte zweier Gruppen gegenübergestellt.

Die Daten sind entweder als Mittelwerte \pm Standardfehler (SD) oder als Box-Plots dargestellt. Unterschiede ab $p < 0.05$ wurden als signifikant erachtet.

4. ERGEBNISSE

Um die Rolle von MC-1R-vermittelten Signalwegen im osteoartikulären System *in vivo* zu untersuchen, stellt die MC-1R^{e/e}-Maus (Mc1r-Maus) ein ideales Modell dar. In dieser Maus liegt der MC-1R aufgrund einer Nukleotid-Deletion als signaldefizienter Rezeptor vor, so dass die Wirkung von Melanocortinen wie α -MSH nicht über ihn vermittelt werden kann.

Um Aussagen über das osteoartikuläre System in Mc1r-Mäusen zu treffen, wurden sowohl der artikuläre Knorpel als auch die SKP des Kniegelenks histologisch betrachtet. Hierfür wurden pro Kniegelenk jeweils fünf Paraffinschnitte im Abstand von 80 μ m mit Safranin O/Fast Green und Hämatoxylin gefärbt (siehe Material und Methoden, 3.2.2.2 und Abb. 4.1).

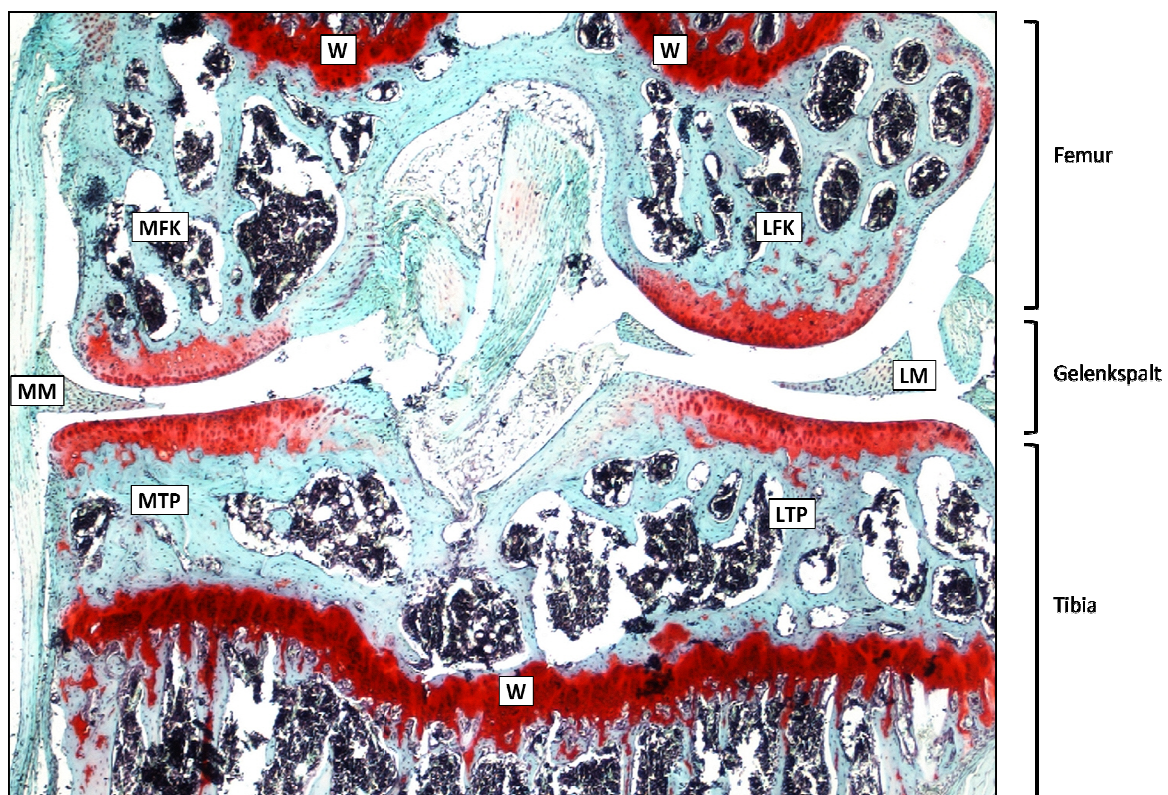


Abb. 4.1: Übersichtsaufnahme eines Safranin O/Fast Green-gefärbten Paraffinschnitts eines murinen Kniegelenks (40-fache Vergrößerung). Frontale Sektion durch das linke Kniegelenk einer WT-Maus. Die rot gefärbten, nicht als Wachstumsfuge (W) bezeichneten Bereiche zum Gelenkspalt hin stellen den artikulären Knorpel dar. Zellkerne sind durch Hämatoxylin-Gegenfärbung blau dargestellt. MM = Medialer Meniskus, MFK = Medialer Femurkondylus, MTP = Mediales Tibiaplateau, LM = Lateraler Meniskus, LFK = Lateraler Femurkondylus, LTP = Laterales Tibiaplateau, W = Wachstumsfuge.

Die Untersuchung des artikulären Knorpels beruht bei dieser Färbemethode auf der Betrachtung des Proteoglykan-Gehalts und der Chondrozyten-Verteilung. Die Proteoglykane werden durch die rote Safranin O-Färbung im artikulären Knorpel sichtbar, die Chondrozyten durch die blauen Hämatoylin-gefärbten Zellkerne.

Bei Knorpelschäden kommt es zu Proteoglykan- und Chondrozyten-Verlust, was sich in dieser Färbung durch Abnahme der roten Farbintensität und Verschwinden der blauen Zellkerne widerspiegelt. Durch ein histologisches Scoring oder durch eine morphometrische Auswertung kann der Schweregrad des Knorpelschadens bestimmt werden (siehe Material und Methoden, 3.2.3.1). Hierfür wird jeweils der artikuläre Knorpel der zwei medialen Quadranten des Kniegelenks (medialer Femurkondylus und mediales Tibiaplateau) betrachtet.

Die Analyse der SKP kann durch eine morphometrische Auswertung durchgeführt werden, in der die Fläche der SKP des medialen Tibiaplateaus bewertet wird (siehe Material und Methoden, 3.2.3.2).

Zur Charakterisierung des osteoartikulären Systems in Mc1r-Mäusen wurde zunächst das gesunde Kniegelenk der Mc1r-Mäuse betrachtet. Hierfür wurde sowohl der artikuläre Knorpel als auch die SKP histologisch evaluiert.

Der artikuläre Knorpel wurde nach Safranin O/Fast Green-Färbung durch ein histologisches Scoring und durch eine morphometrische Auswertung auf osteoarthrotische Schäden wie Proteoglykan- und Chondrozytenverlust hin untersucht. Außerdem wurde der Gehalt und die Verteilung von Typ-II Kollagen durch eine immunohistochemische Färbung dargestellt (siehe Material und Methoden, 3.2.2.3).

Die SKP wurde nach Safranin O/Fast Green-Färbung ebenfalls durch eine morphometrische Untersuchung bewertet.

Nach der Charakterisierung des gesunden Kniegelenks der Mc1r-Mäuse sollten die Veränderungen im artikulären Knorpel und in der SKP während der Entwicklung einer OA bestimmt werden.

Zur Induktion der OA wurde am jeweils rechten Kniegelenk der Mäuse eine chirurgische Destabilisierung des medialen Meniskus (DMM) durchgeführt, bei der das mediale meniskotibiale Ligament (MMTL) durchtrennt wurde. Als Kontrolle diente das linke Kniegelenk, das gleichzeitig einer Sham-OP unterzogen wurde, bei der das MMTL dargestellt, aber nicht durchtrennt wurde (siehe Material und Methoden, 3.2.1).

Um die osteoartikulären Veränderungen im Verlauf der OA darzustellen, wurden die Kniegelenke zu verschiedenen Zeitpunkten nach chirurgischer Induktion (4, 6 und 8 Wochen) entnommen und für histologische Untersuchungen präpariert.

Zunächst sollte gezeigt werden, ob sich die DMM-Methode zur Induktion einer milden bis moderaten OA, wie in der Literatur beschrieben, eignet (68). Deshalb wurde die Ausprägung der OA in DMM-Kniegelenken von WT-Mäusen zu den verschiedenen Zeitpunkten in Bezug auf Sham-Kniegelenke evaluiert. Auch hier wurden sowohl der artikuläre Knorpel als auch die SKP wie beschrieben untersucht.

Zur Charakterisierung des Kniegelenks von Mc1r-Mäusen im Verlauf einer OA wurden auch bei diesen Mäusen die Kniegelenke 4, 6 und 8 Wochen nach OA-Induktion histologisch evaluiert. Um zu untersuchen, welche Rolle der MC-1R-Signalweg während der Entwicklung einer OA spielt, wurden die osteoarthrotischen Veränderungen des artikulären Knorpels und der SKP in DMM-Kniegelenken von Mc1r-Mäusen mit denen von WT-Mäusen vergleichend dargestellt.

4.1 CHARAKTERISIERUNG DES GESUNDEN KNIEGELENKS VON MC-1RE/E-MÄUSEN

Bisher ist keine Charakterisierung des osteoartikulären Systems der Mc1r-Maus bekannt. Daher sollte zunächst gezeigt werden, ob das gesunde Kniegelenk von Mc1r-Mäusen Unterschiede zum gesunden Kniegelenk von WT-Mäusen aufweist. Hierfür wurde der artikuläre Knorpel und die SKP der Kniegelenke beider Stämme histologisch untersucht.

4.1.1 BEOBACHTUNGEN IM ARTIKULÄREN KNORPEL

Safranin O/Fast Green-Färbung

Um den artikulären Knorpel von Mc1r-Mäusen im Vergleich zum WT zu charakterisieren, wurden Safranin O/Fast Green-gefärbte Paraffinschnitte von gesunden Kniegelenken männlicher und weiblicher Mäuse herangezogen (siehe Material und Methoden, 3.2.2.2).

Mit dieser Färbung und der darauffolgenden Auswertung werden vor allem der Proteoglykan-Gehalt und die Chondrozyten-Verteilung im artikulären Knorpel bestimmt.

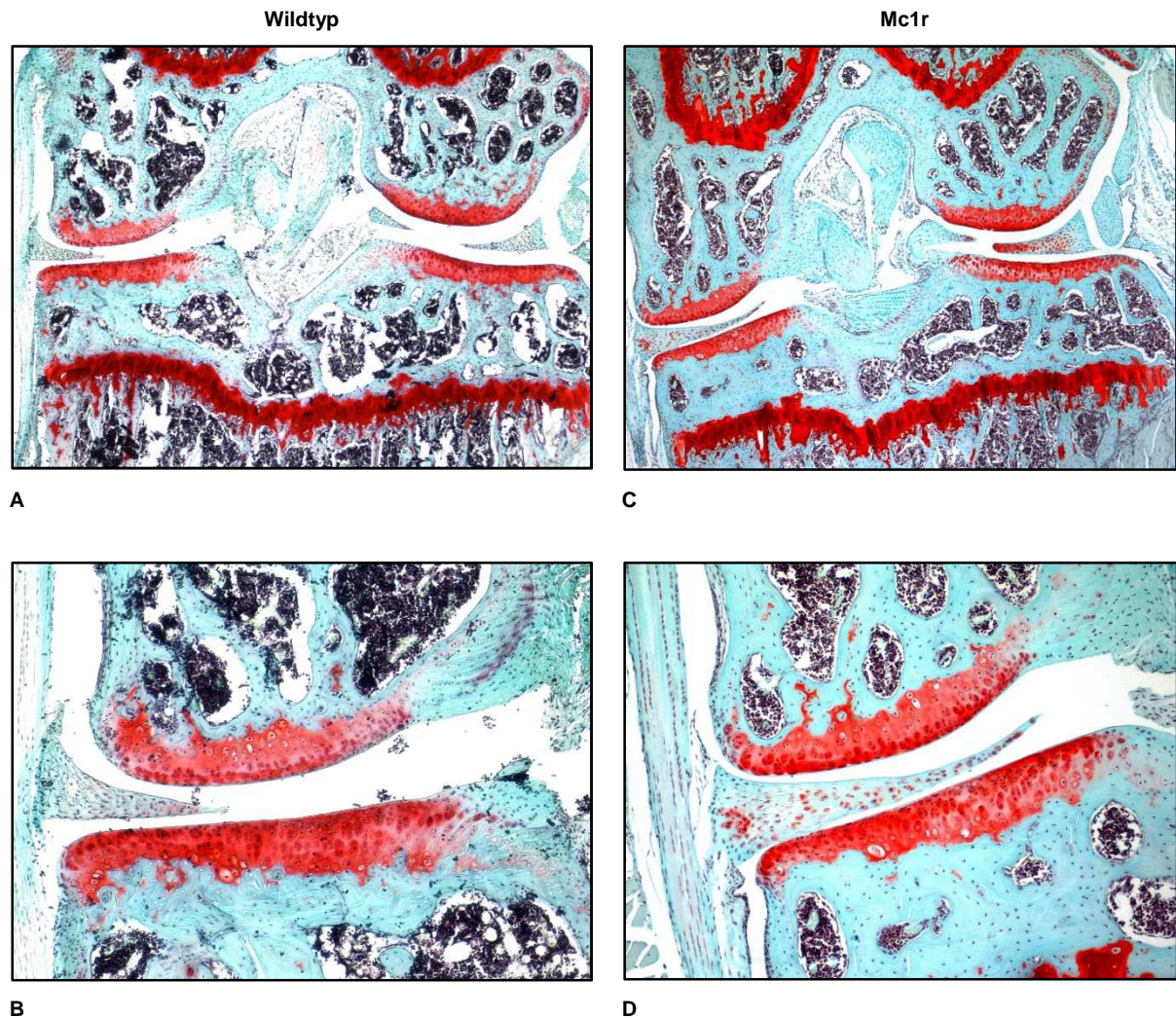


Abb. 4.2: Safranin O/Fast Green gefärbte Paraffinschnitte muriner Kniegelenke. Frontale Sektionen durch das linke, Sham-operierte Kniegelenk 8 Wochen nach der OP von WT-Mäusen (**A, B**) bzw. Mc1r-Mäusen (**C, D**). Übersichtsaufnahmen (**A, C**, 40-fache Vergrößerung). Medialer Bereich (**B, D**, 100-fache Vergrößerung).

Wie Abb. 4.2 repräsentativ für alle untersuchten Kniegelenke darstellt, zeigen sich weder bei WT-Mäusen (A, B) noch bei Mc1r-Mäusen (C, D) Farbverlust, Abschilferungen oder Einrisse und Erosionen im artikulären Knorpel. Sowohl beim histologischen Scoring als auch bei der morphometrischen Auswertung ließen sich weder bei männlichen noch bei weiblichen Mäusen Veränderungen im Proteoglykan-Gehalt oder in der Chondrozyten-Verteilung beobachten.

Der Aufbau des artikulären Knorpels in MC-1R-signaldefizienten Mäusen entspricht was den Proteoglykan-Gehalt und die Chondrozyten-Verteilung betrifft, demnach dem von WT-Mäusen. Weder in Mc1r- noch in WT-Mäusen zeigt sich ein Geschlechtsdimorphismus hinsichtlich der untersuchten Bestandteile des gesunden Knorpels.

Typ-II Kollagen-Färbung

Da Typ-II Kollagen neben Proteoglykan als Hauptbestandteil des artikulären Knorpels gilt, wurde untersucht, ob Unterschiede in dessen Gehalt oder Verteilung in Mc1r-Mäusen existieren. Hierfür wurden Paraffinschnitte von Sham-operierten Kniegelenken beider Maus-Stämme mit einem Typ-II Kollagen-Antikörper immunohistochemisch angefärbt (siehe Material und Methoden, 3.2.2.3).

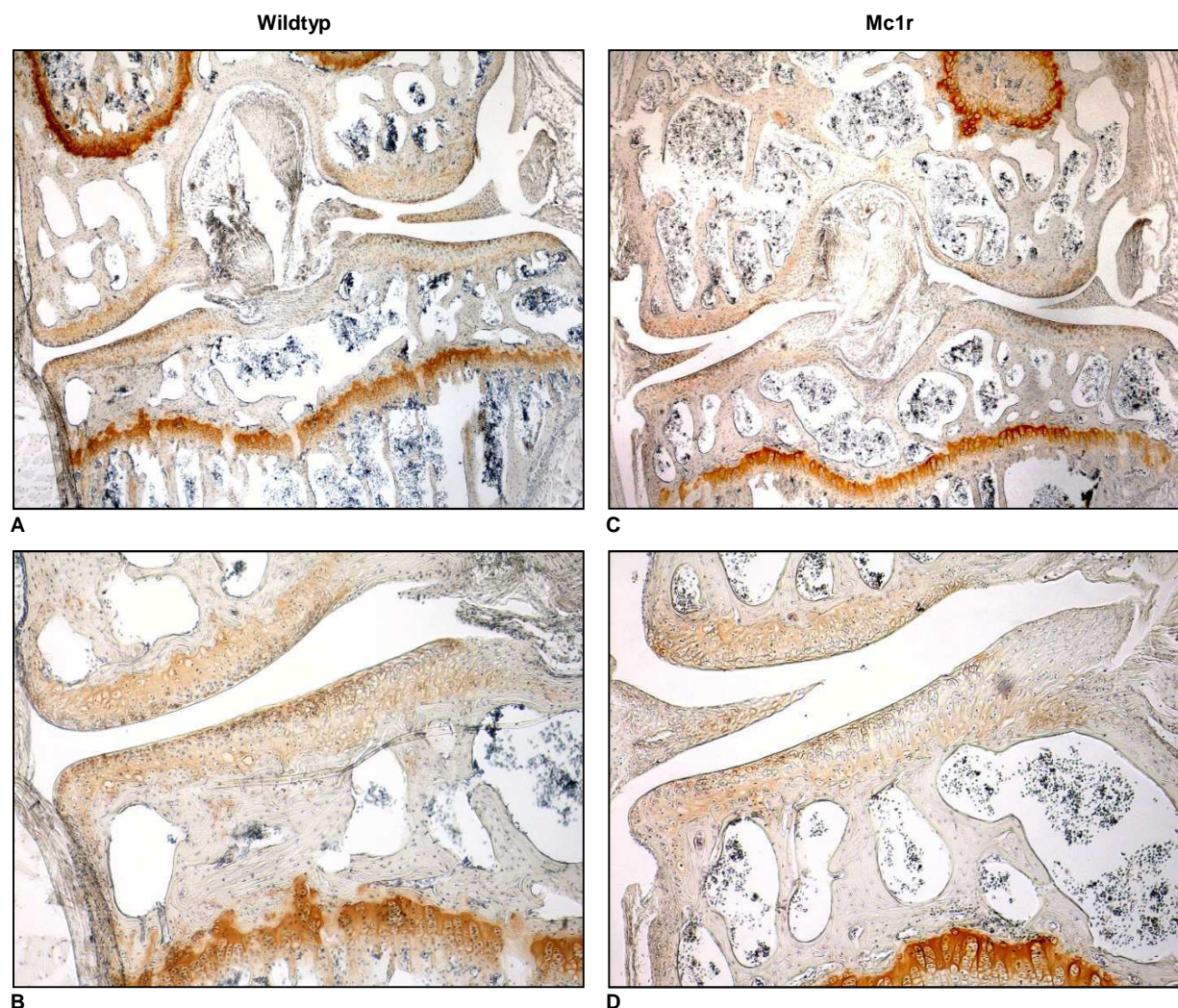


Abb. 4.3: Typ-II Kollagen-gefärbte Paraffinschnitte muriner Kniegelenke. Frontale Sektionen durch das linke, Sham-operierte Kniegelenk 6 Wochen nach der OP von WT-Mäusen (**A, B**) bzw. Mc1r-Mäusen (**C, D**). Übersichtsaufnahmen (**A, C**, 40-fache Vergrößerung). Mediale Region (**B, D**, 100-fache Vergrößerung).

Wie in Abb. 4.3 exemplarisch zu sehen ist, lässt sich kein Unterschied im Gehalt oder in der Verteilung von Typ-II Kollagen in MC-1R-signaldefizienten Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen erkennen. Auch geschlechtsspezifische Unterschiede konnten nicht beobachtet werden.

Der artikuläre Knorpel gesunder Kniegelenke von Mc1r-Mäusen weist also auch Typ-II Kollagen betreffend gleiche Eigenschaften wie der von WT-Mäusen auf. Weder bei Mc1r- noch bei WT-Mäusen zeigen sich Unterschiede hinsichtlich der Verteilung von Typ-II Kollagen zwischen den Geschlechtern.

4.1.2 BEOBACHTUNGEN IN DER SKP

Da auch die SKP im Verlauf einer OA von Veränderungen betroffen ist, wurde zunächst untersucht, ob gesunde Kniegelenke von MC-1R-signaldefizienten Mäusen Unterschiede in der Flächengröße der SKP zu WT-Mäusen aufweisen. Dabei wurde die Fläche der medialen tibialen SKP beider Mausstämme durch eine morphometrische Auswertung bei den gesunden Kniegelenken der Sham-Kontrollen vergleichend dargestellt (siehe Material und Methoden, 3.2.3.2).

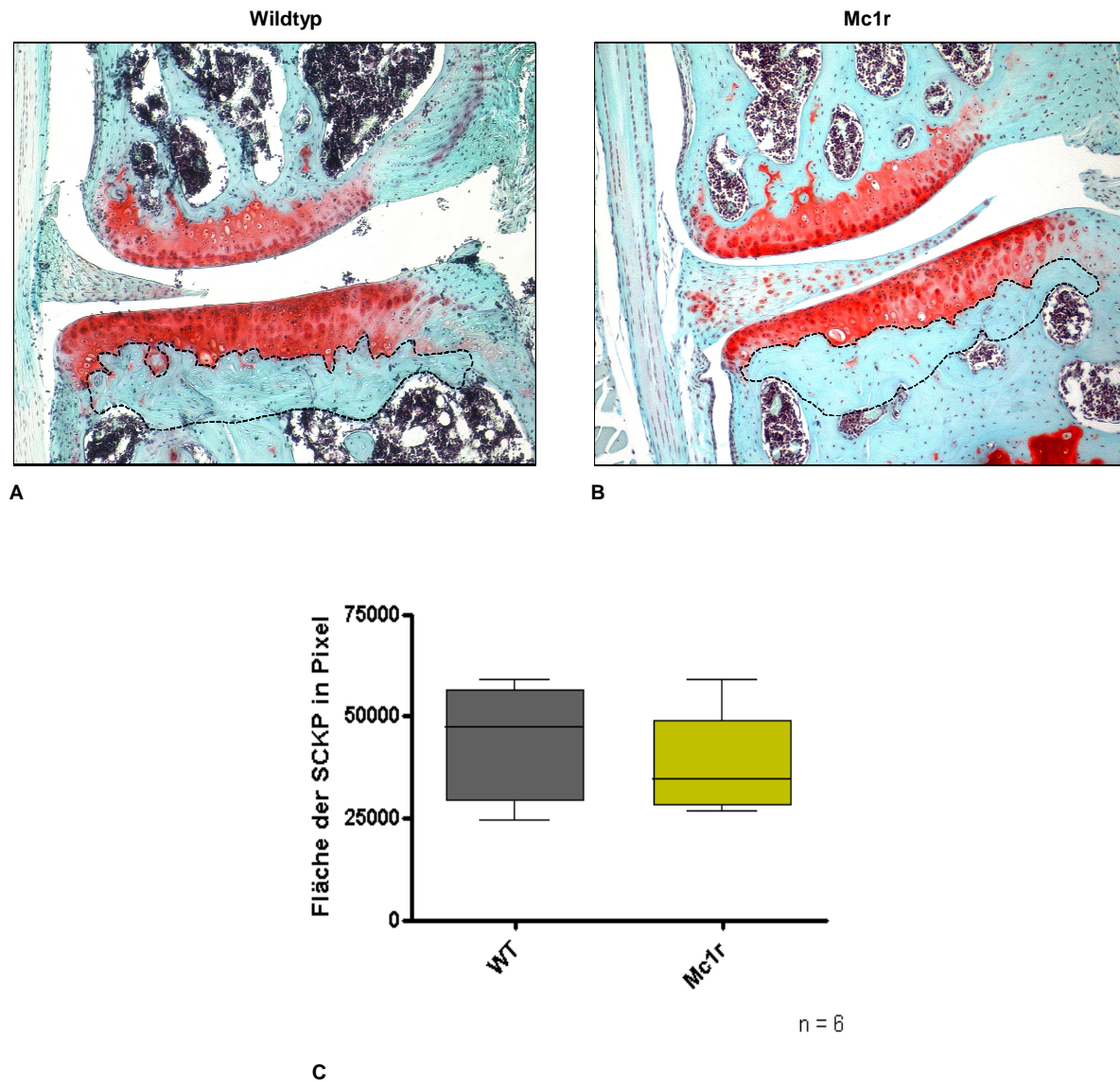


Abb. 4.4: Untersuchungen der SKP (SKP) in gesunden Kniegelenken.

A, B) Frontale Sektionen durch das linke, Sham-operierte Kniegelenk von WT-Mäusen (**A**) bzw. Mc1r-Mäusen (**B**) 8 Wochen nach der OP. Medialer Bereich (100-fache Vergrößerung). - - - - : SKP

C) Vergleichende Beurteilung der SKP in Sham-operierten Kniegelenken von WT- bzw Mc1r-Mäusen 8 Wochen nach der OP.

Die morphometrische Auswertung Sham-operierter Kniegelenke von männlichen und weiblichen WT- und Mc1r-Mäusen zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der OA ergab keine Unterschiede in der Flächengröße der SKP (Abb. 4.4).

Da in der Literatur wiederholt geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der Veränderungen des artikulären Knorpels im Verlauf einer OA beschrieben wurden, wurde auch die Fläche der SKP in gesunden Kniegelenken von Mc1r- und WT-Mäusen getrenntgeschlechtlich bewertet (Abb. 4.5) (30-34).

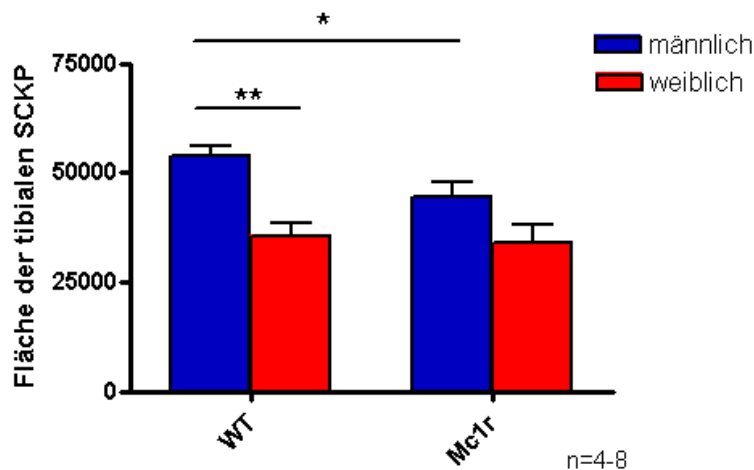


Abb. 4.5: Beurteilung geschlechtsspezifischer Unterschiede der SKP in gesunden Kniegelenken von WT- und Mc1r-Mäusen.

Bei WT-Mäusen lässt sich in Abb. 4.5 ein Geschlechtsdimorphismus was die SKP in gesunden Kniegelenken betrifft erkennen: die SKP ist bei männlichen WT-Mäusen im Vergleich zu weiblichen deutlich verdickt. Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede lassen sich bei Mc1r-Mäusen kaum beobachten. Im Vergleich zwischen männlichen WT-Mäusen und männlichen Mc1r-Mäusen zeigt sich eine signifikant kleinere Fläche der SKP bei männlichen Mc1r-Mäusen. Zwischen weiblichen WT-Mäusen und weiblichen Mc1r-Mäusen ist kein Unterschied zu erkennen.

Nach getrenntgeschlechtlicher Betrachtung der Fläche der gesunden SKP unterscheiden sich Mc1r-Mäuse von WT-Mäusen hinsichtlich des Geschlechtsdimorphismus, der nur bei WT-Mäusen auftritt. Außerdem ist die Fläche der SKP männlicher Mc1r-Mäuse im Vergleich zu männlichen WT-Mäusen signifikant kleiner.

Aufgrund der Untersuchungen im gesunden Kniegelenk von Mc1r-Mäusen lässt sich zusammenfassend sagen, dass sich die Struktur des artikulären Knorpels signaldefizienter Mäuse augenscheinlich weder im Proteoglykan-, Chondrozyten- noch im Typ-II Kollagen-Gehalt von der der WT-Mäuse unterscheidet. Auch geschlechtsspezifische Unterschiede sind in den untersuchten Bestandteilen des artikulären Knorpels gesunder Kniegelenke nicht zu beobachten.

Was die Fläche der SKP betrifft zeigen sich allerdings Unterschiede zwischen gesunden Mc1r- und WT-Mäusen. Bei WT-Mäusen ist im Gegensatz zu Mc1r-Mäusen ein deutlicher Geschlechtsdimorphismus in der Fläche der SKP zu erkennen. Außerdem ist die Fläche der SKP gesunder Kniegelenke in männlichen Mc1r-Mäusen kleiner als in männlichen WT-Mäusen.

4.2 CHARAKTERISIERUNG DES KNIEGELENKS VON MC-1RE/E-MÄUSEN IM VERLAUF EINER OSTEOARTHROSE

4.2.1 DIE CHIRURGISCHE INDUKTION DER OSTEOARTHROSE DURCH DESTABILISIERUNG DES MEDIALEN MENISKUS

Um eine OA in murinen Kniegelenken zu induzieren, wurde eine chirurgische Destabilisierung des medialen Meniskus (DMM) durch Inzision des medialen meniskotibialen Ligaments (MMTL) durchgeführt (siehe Material und Methoden, 3.2.1 und Abb. 4.6).

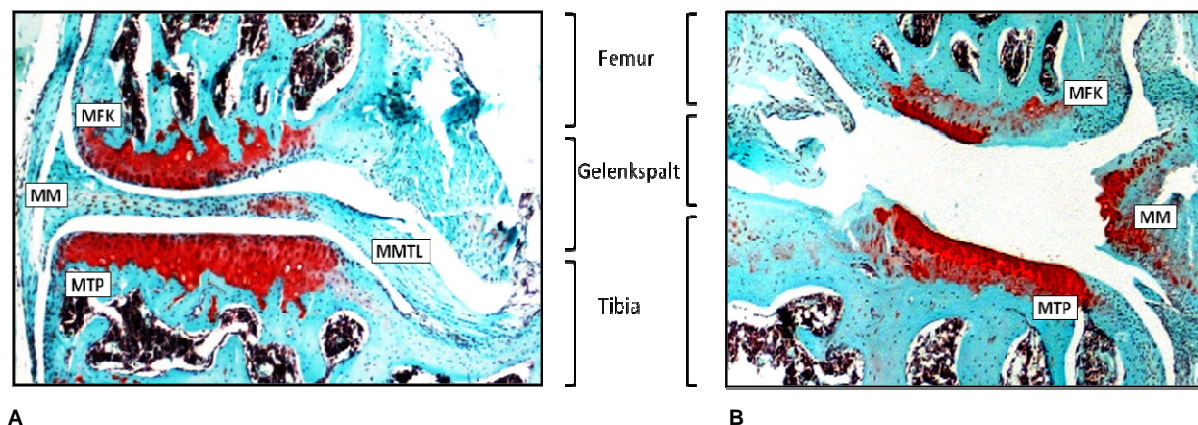


Abb. 4.6: Mediale Regionen Safranin O/Fast Green-gefärbter Paraffinschnitte muriner WT-Kniegelenke. Frontale Sektionen durch das linke, Sham-operierte Kniegelenk (**A**) bzw. das rechte, DMM-operierte Kniegelenk (**B**) 6 Wochen nach der OP (100-fache Vergrößerung). Das Sham-operierte Kniegelenk (**A**) zeigt ein intaktes mediales meniskotibiales Ligament (MMTL), das beim DMM-operierten Kniegelenk (**B**) eindeutig durchtrennt ist. MMTL = Mediales meniskotibiales Ligament, MM = Medialer Meniskus, MFK = Medialer Femurkondylus, MTP = Mediales Tibiplateau.

Die Kniegelenke wurden nach CO₂-Euthanasie der Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der OA (4, 6 und 8 Wochen) entnommen, fixiert, entkalkt, in Paraffin eingebettet und in 5 µm dicke Schnitte geschnitten (siehe Material und Methoden, 3.2.2.1).

Um die Ausprägung der OA histologisch darzustellen, wurden pro Kniegelenk fünf Schnitte im Abstand von 80 µm mit Safranin O/Fast Green und Hämatoxylin gefärbt. Es wurden sowohl Veränderungen im artikulären Knorpel als auch Veränderungen in der SKP beurteilt.

4.2.1.1 BEOBACHTUNGEN IM ARTIKULÄREN KNORPEL

Mithilfe der chirurgischen Induktion der OA wurde zunächst untersucht, wie sich die Ausprägung der OA im artikulären Knorpel bei WT-Mäusen in den DMM-Kniegelenken im Vergleich zu den Sham-Kontrollen und im Zeitverlauf (4, 6 oder 8 Wochen nach Induktion der OA) verhält (Abb. 4.8).

Um die Ausprägung der OA den artikulären Knorpel betreffend beurteilen zu können (Abb. 4.8, E-H), wurden pro Kniegelenk fünf Schnitte im Abstand von 80 µm nach Safranin O/Fast Green-Färbung durch das histologische Scoring und durch die morphometrische Auswertung evaluiert (siehe Material und Methoden, 3.2.3.1).

Das in dieser Arbeit leicht modifizierte Scoring nach Glasson *et al.*, 2010 teilt die OA in verschiedene Grade von Grad 0 (keine OA) bis Grad 6 (sehr schwere OA) ein (siehe Material und Methoden, Tab. 3.2) (10).

Bei der morphometrischen Auswertung wurde die zell- und farblose Knorpelfläche und die Gesamtknorpelfläche bestimmt (Abb. 4.7) und der prozentuale Anteil der geschädigten Knorpelfläche in Bezug zur Gesamtknorpelfläche berechnet.

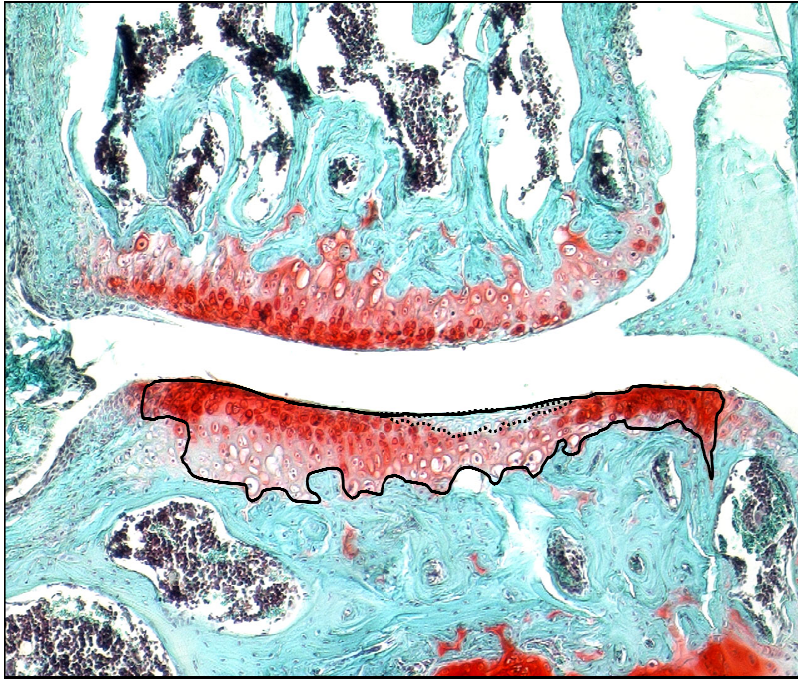


Abb. 4.7: Morphometrische Auswertung des artikulären Knorpels. Mediale Region eines Safranin O/Fast Green-gefärbten Paraffinschnittes eines WT-Kniegelenks (100-fache Vergrößerung). Frontale Sektion durch das rechte, DMM-operierte Kniegelenk 4 Wochen nach OA-Induktion.
..... : zell- und farblose Knorpelfläche. _____ : Gesamtknorpelfläche.

In den in Abb. 4.8 repräsentativ dargestellten histologischen Aufnahmen (A-D) können folgende Unterschiede beobachtet werden: bei der Kontrolle (A) ist der artikuläre Knorpel durchgehend rot angefärbt, es lassen sich keine zellfreien Bereiche oder Abschlüferungen, Einrisse und Erosionen erkennen. In DMM-operierten Kniegelenken sind zu jedem Zeitpunkt Läsionen zu erkennen, die sowohl im medialen Femurkondylus (MFK) als auch im medialen Tibiaplateau (MTP) zentral lokalisiert sind. 4 Wochen nach Induktion der OA (B) kann ein zell- und farbloses Areal im MFK bzw. im MTP beobachtet werden. 6 und 8 Wochen nach Induktion der OA (C und D) erscheint dieses Areal größer, außerdem sind Einrisse und Erosionen zu sehen.

Die Veränderungen im medialen artikulären Knorpel von WT-Mäusen sind bereits 4 Wochen nach Induktion der OA sichtbar und werden nach 6 und 8 Wochen immer deutlicher.

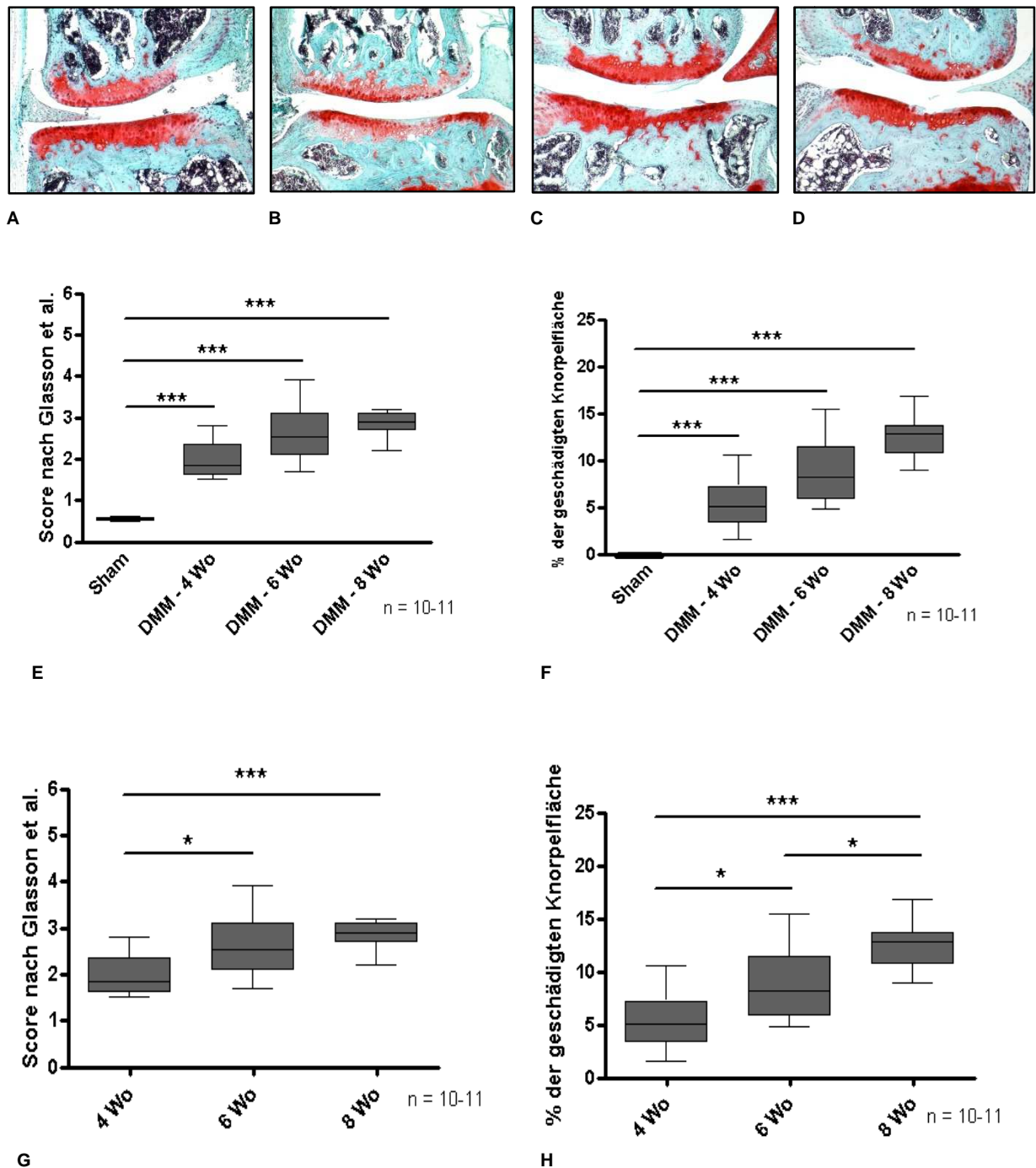


Abb. 4.8: Untersuchungen des artikulären Knorpels nach OA-Induktion in WT-Mäusen.

A-D) Mediale Regionen Safranin O/Fast Green-gefärbter Paraffinschnitte muriner WT-Kniegelenke (100-fache Vergrößerung). Frontale Sektionen durch das linke, Sham-operierte Kniegelenk 8 Wochen nach der OP (**A**) bzw. durch das rechte, DMM-operierte Kniegelenk 4 Wochen (**B**), 6 Wochen (**C**) bzw. 8 Wochen (**D**) nach der OP.

E, F) Beurteilung des artikulären Knorpels im WT zu verschiedenen Zeitpunkten nach OA-Induktion im Vergleich zur Kontrolle (Sham). **E)** Histologisches Scoring. **F)** Morphometrische Auswertung.

G, H) Beurteilung des artikulären Knorpels im WT nach OA-Induktion im zeitlichen Verlauf. **G)** Histologisches Scoring. **H)** Morphometrische Auswertung.

In Abb. 4.8 zeigt sich sowohl beim histologischen Scoring als auch bei der morphometrischen Auswertung in DMM-Kniegelenken ein deutlicher Verlust im artikulären Knorpel im Vergleich zur Sham-Kontrolle (E, F). 4 Wochen nach Induktion der OA sind vertikale Einrisse direkt unterhalb der oberflächlichen Knorpelschicht erkennbar, was nach dem histologischen Scoring Grad 2 entspricht. 6 Wochen nach Induktion sind zunehmend Safranin O-Farbverlust und Zellverlust zu beobachten, wodurch sich im Durchschnitt Grad 2,5 ergibt, während 8 Wochen nach Induktion Einrisse, Safranin O-Farbverlust und Zellverlust bei bis zu 25 % der Knorpelfläche zu beobachten sind, was mit Grad 3 bewertet wird.

In der morphometrischen Auswertung beträgt der prozentuale Knorpelverlust 4 Wochen nach Induktion ca. 5 % des gesamten Knorpels, 6 Wochen nach Induktion ca. 8 % und 8 Wochen nach Induktion ca. 12 %.

Im zeitlichen Verlauf der OA kann in DMM-Kniegelenken beim histologischen Scoring ein signifikanter Unterschied zwischen 4 und 6 Wochen und zwischen 4 und 8 Wochen nach Induktion der OA (G) beobachtet werden, bei der morphometrischen Auswertung ist auch die Steigerung der OA von 6 zu 8 Wochen signifikant (H). Somit konnte gezeigt werden, dass sich der Grad der OA im Zeitverlauf zunehmend verschlimmert, wobei sich der treppenförmige Anstieg im Zeitverlauf bei der morphometrischen Auswertung deutlicher zeigt als beim histologischen Scoring.

Wie die Abb. 4.8 zeigt, ruft die chirurgische Induktion der OA mithilfe der DMM-Methode wie in der Literatur beschrieben eine sehr gut reproduzierbare, milde bis moderate OA hervor, deren Verlauf langsam fortschreitet (68).

In der Literatur werden während der OA-Entwicklung wiederholt geschlechtsspezifische Unterschiede im artikulären Knorpel beschrieben (30-34). Sowohl bei spontaner OA als auch bei induzierter OA verläuft die Erkrankung bei männlichen Mäusen schwerer als bei weiblichen, wobei der Grad und das zeitliche Auftreten dieses Effektes dabei von Stamm und Art der Induktion abhängig ist. Abb. 4.9 zeigt den Grad der DMM-induzierten OA von männlichen und weiblichen WT-Mäusen im histologischen Scoring und in der morphometrischen Auswertung.

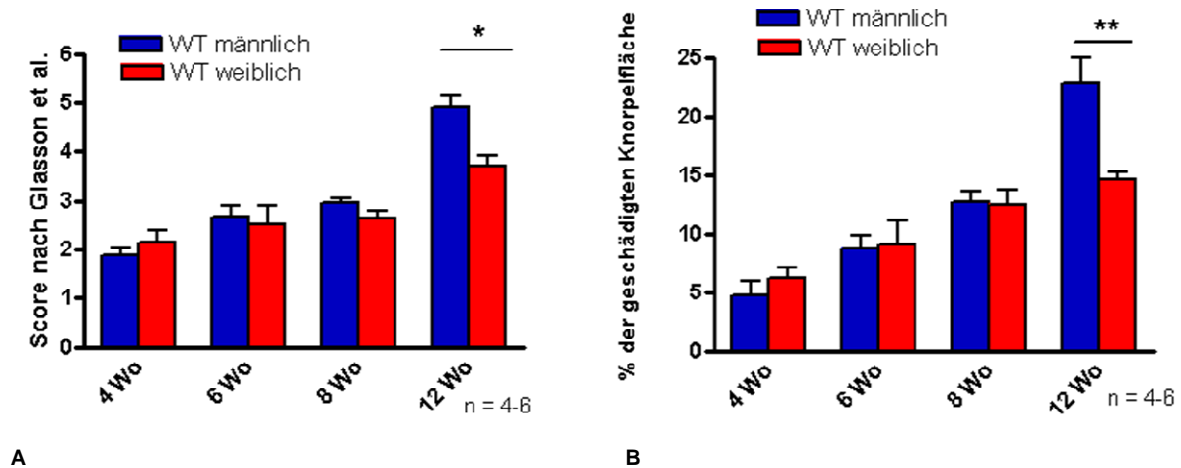


Abb. 4.9: Beurteilung geschlechtsspezifischer Unterschiede des artikulären Knorpels in der OA-Entwicklung bei WT-Mäusen. **A)** Histologisches Scoring. **B)** Morphometrische Auswertung.

Weder 4, 6 noch 8 Wochen nach Induktion zeigt sich ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Ausprägung der OA bei WT-Mäusen. Bei WT-Mäusen konnte zusätzlich auf Kniegelenke, die 12 Wochen nach Induktion der OA entnommen wurden, zurückgegriffen werden. Hier lässt sich im histologischen Scoring bei männlichen WT-Mäusen eine signifikant schwerere OA als bei weiblichen erkennen, was in der morphometrischen Auswertung noch deutlicher wird.

12 Wochen nach OA-Induktion zeigen weibliche Mäuse Einrisse, Safranin O-Farbverlust und Zellverlust bei bis zu 50 % der Knorpelfläche (Grad 4), während diese Schäden bei männlichen Tieren bis zu 75 % der Knorpelfläche einnehmen (Grad 5).

Nach der morphometrischen Auswertung sind 12 Wochen nach OA-Induktion bei weiblichen WT-Mäusen ca. 15 % der Knorpelfläche beschädigt, bei männlichen WT-Mäusen sind es ca. 25 %.

Die geschlechtsspezifischen Unterschiede im artikulären Knorpel während der Entwicklung einer OA konnten beim WT 12 Wochen nach Induktion der OA beobachtet werden.

4.2.1.2 BEOBACHTUNGEN IN DER SKP

Da bei einer OA neben Veränderungen im artikulären Knorpel auch Veränderungen in der SKP beobachtet werden können, wurde diese ebenfalls in die morphometrische Auswertung involviert. In Safranin O/Fast Green-gefärbten Sektionen von WT-Kniegelenken wurde jeweils die tibiale SKP im medialen Bereich untersucht (Abb. 4.10) (54-58). Die Veränderungen der SKP während der Entwicklung einer OA wurden getrenntgeschlechtlich

dargestellt, da bei WT-Mäusen bereits in gesunden Kniegelenken geschlechtsspezifische Unterschiede beobachtet werden können (Abb. 4.5).

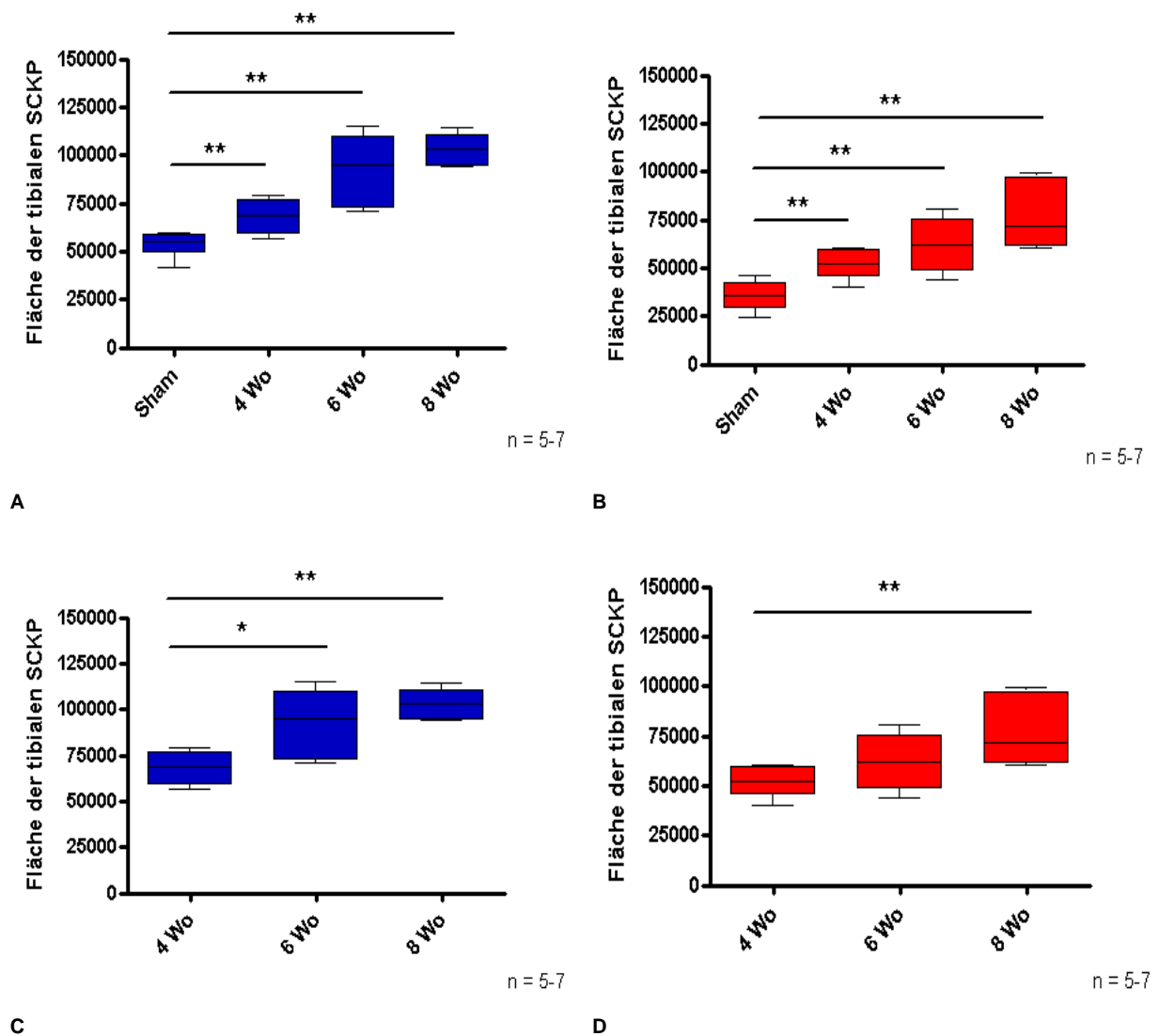


Abb. 4.10: Untersuchungen der SKP nach OA-Induktion in WT-Mäusen.

Vergleichende Beurteilung der SKP im Verlauf einer OA in Bezug zur Sham-operierten Kontrolle (**A, B**) bzw. im zeitlichen Verlauf (**C, D**) bei männlichen (**A, C**) bzw. weiblichen (**B, D**) WT-Mäusen.

Abb. 4.10 zeigt die Veränderungen der Fläche der SKP bei männlichen (**A, C**) und weiblichen (**B, D**) WT-Mäusen 4, 6 und 8 Wochen nach Induktion der OA im Vergleich zur Sham-Kontrolle (**A, B**) und im zeitlichen Verlauf (**C, D**). Die Fläche der SKP ist in Kniegelenken beider Geschlechter mit OA-Induktion zu jedem Zeitpunkt größer als in Kniegelenken ohne OA-Induktion (**A, B**). Im zeitlichen Verlauf der OA nimmt die Fläche der SKP tendenziell zu, was sich in einem treppenförmigen Anstieg zwischen 4, 6 und 8 Wochen nach der Induktion zeigt (**C, D**), der sich bei männlichen WT-Mäusen deutlicher darstellt.

In Abb. 4.11 sind die geschlechtsspezifischen Unterschiede hinsichtlich der Veränderungen der SKP im Verlauf einer OA im direkten Vergleich dargestellt.

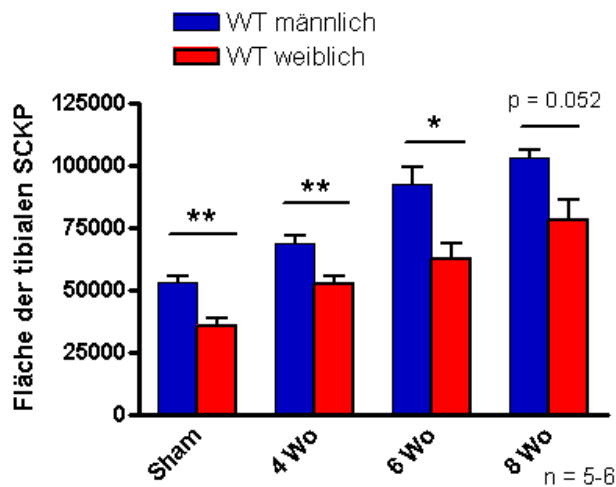


Abb. 4.11: Beurteilung geschlechtsspezifischer Unterschiede der SKP in der OA-Entwicklung bei WT-Mäusen.

Wie in Abb. 4.11 zu erkennen ist, ist bei WT-Mäusen sowohl in gesunden als auch in osteoarthrotischen Kniegelenken ein Geschlechtsdimorphismus hinsichtlich der SKP zu beobachten. Die Fläche der SKP männlicher WT-Mäuse ist bereits in gesunden Kniegelenken dicker als die weiblicher WT-Mäuse. Diese geschlechtsspezifischen Unterschiede bleiben im Verlauf der OA bestehen.

Während der Entwicklung einer OA lassen sich bei WT-Mäusen geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der Veränderungen im artikulären Knorpel beobachten.

Was die SKP betrifft besteht bereits in gesunden Kniegelenken ein Geschlechtsdimorphismus, der im Laufe der OA erhalten bleibt.

4.2.2 DER VERLAUF DER OSTEOARTHROSE BEI MC-1RE/E-MÄUSEN

4.2.2.1 BEOBACHTUNGEN IM ARTIKULÄREN KNORPEL

Um die Rolle von MC-1R-vermittelten Signalwegen im Verlauf einer OA zu untersuchen, wurde auch in Kniegelenken von Mc1r-Mäusen eine chirurgische Induktion der OA durch die DMM durchgeführt. Die Ausprägung der OA im artikulären Knorpel wurde nach Safranin O/Fast Green-Färbung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion (4, 6 und 8 Wochen) histologisch dargestellt und nach histologischer und morphometrischer Auswertung statistisch analysiert (Abb. 4.12).

In den histologischen Aufnahmen (A-D) können folgende Unterschiede beobachtet werden: der artikuläre Knorpel bei der Kontrolle (A) ist durchgehend rot angefärbt, es sind keine Abschlüferungen, Einrisse oder Erosionen zu erkennen. 4 Wochen nach Induktion der OA (B) kann ein zell- und farbloses Areal im artikulären Knorpel des MFK bzw. des MTP erkannt werden, auch Einrisse sind zu sehen. Ein ähnliches Bild zeigt sich 6 und 8 Wochen nach Induktion der OA (C und D).

Um die Ausprägung der OA den artikulären Knorpel betreffend statistisch auszuwerten (E-H), wurden pro Kniegelenk 5 Schnitte im Abstand von 80 µm nach Safranin O/Fast Green-Färbung durch das histologische Scoring und durch die morphometrische Auswertung evaluiert.

Sowohl beim histologischen Scoring als auch bei der morphometrischen Auswertung zeigt sich in DMM-Kniegelenken ein deutlicher artikulärer Knorpelschaden im Vergleich zu Sham-Kniegelenken (E, F). 4 Wochen nach Induktion der OA sind Einrisse, Safranin O-Farbverlust und Zellverlust bei bis zu 25 % der Knorpelfläche erkennbar, was nach dem histologischen Scoring Grad 3 entspricht. 6 und 8 Wochen nach Induktion ist keine weitere Steigerung zu erkennen, so dass sich hier im Durchschnitt Grad 2.5 ergibt.

Nach der morphometrischen Auswertung ergibt sich 4 Wochen nach Induktion ein prozentualer Knorpelverlust von ca. 12 % des gesamten Knorpels, 6 Wochen nach Induktion beträgt dieser ca. 10 % und 8 Wochen nach Induktion ca. 12 %.

Wie die histologischen Bilder in Abb. 4.12 (A-D) erkennen lassen, unterscheidet sich die Ausprägung der OA zwischen den verschiedenen Zeitpunkten nach OA-Induktion bei Mc1r-Mäusen nicht. Durch histologische Evaluierung und statistische Analyse konnte diese Beobachtung bestätigt werden (G, H). Es zeigt sich kein treppenförmiger Anstieg in der Ausprägung der OA zwischen den verschiedenen Zeitpunkten. Stattdessen ist die OA bereits 4 Wochen nach Induktion auf dem gleichen Level wie 6 und 8 Wochen nach Induktion.

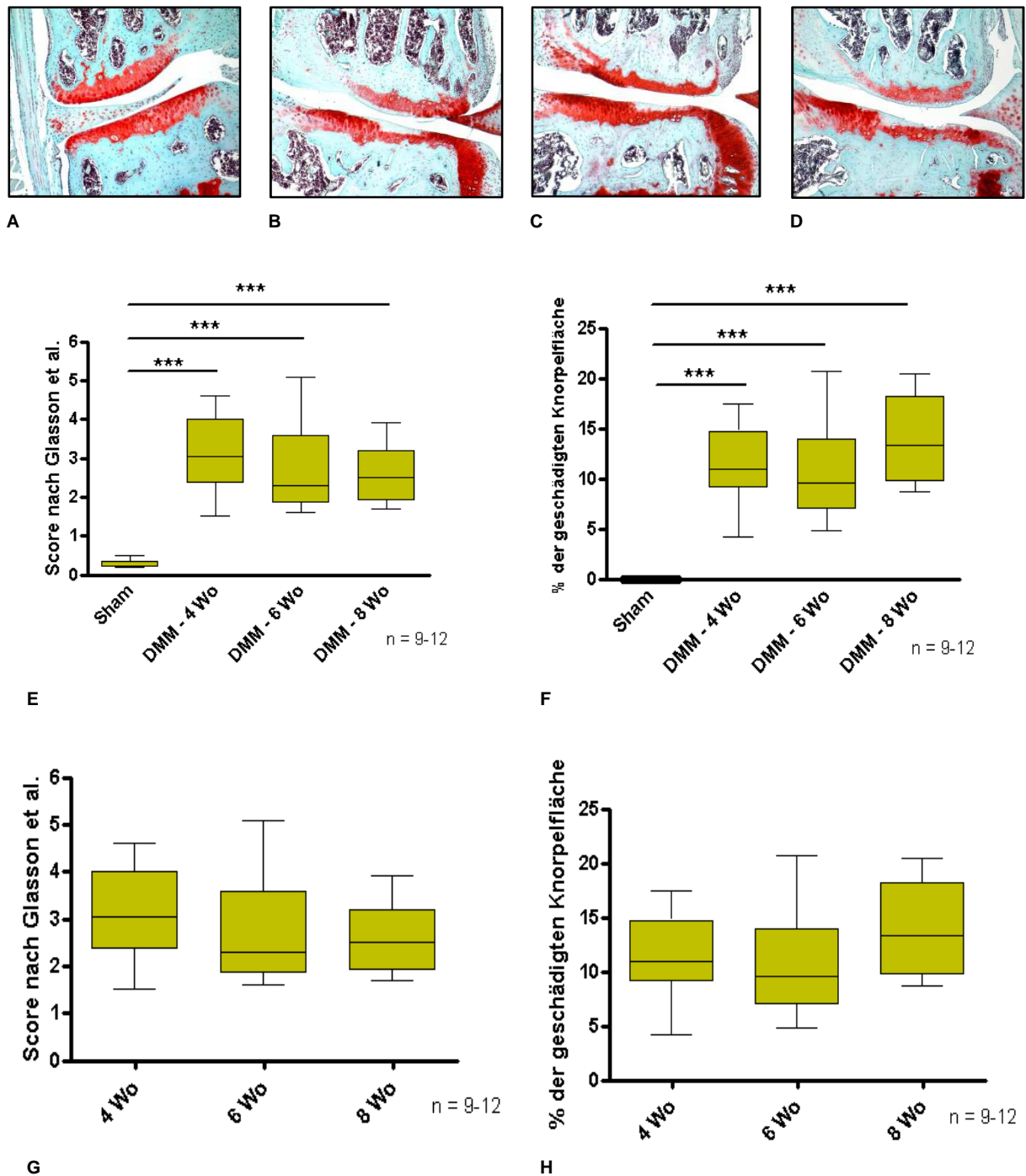


Abb. 4.12: Untersuchungen des artikulären Knorpels nach OA-Induktion in Mc1r-Mäusen.

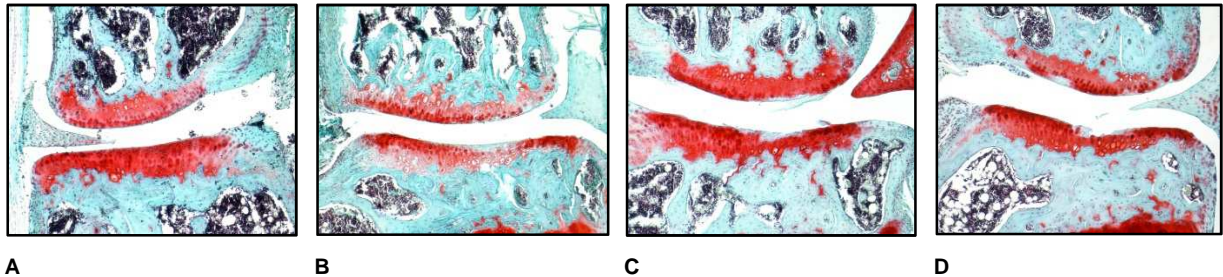
A-D) Mediale Regionen Safranin O/Fast Green-gefärbter Paraffinschnitte muriner Mc1r-Kniegelenke. Frontale Sektionen durch das linke, Sham-operierte Kniegelenk 8 Wochen nach der OP (**A**) bzw. durch das rechte, DMM-operierte Kniegelenk 4 Wochen (**B**), 6 Wochen (**C**) bzw. 8 Wochen (**D**) nach der OP (100-fache Vergrößerung).

E, F) Beurteilung des artikulären Knorpels in Mc1r-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach OA-Induktion im Vergleich zur Kontrolle (Sham). **E)** Histologisches Scoring. **F)** Morphometrische Auswertung.

G, H) Beurteilung des artikulären Knorpels in Mc1r-Mäusen nach OA-Induktion im zeitlichen Verlauf. **G)** Histologisches Scoring. **H)** Morphometrische Auswertung.

Um die Rolle von MC-1R-vermittelten Signalwegen im Verlauf einer OA darzustellen, wurden die osteoarthrotischen Veränderungen des artikulären Knorpels der Mc1r-Mäuse mit denen der WT-Mäuse verglichen (Abb. 4.13).

Wildtyp



Sham	4 Wo	6 Wo	8 Wo
------	------	------	------

Mc1r

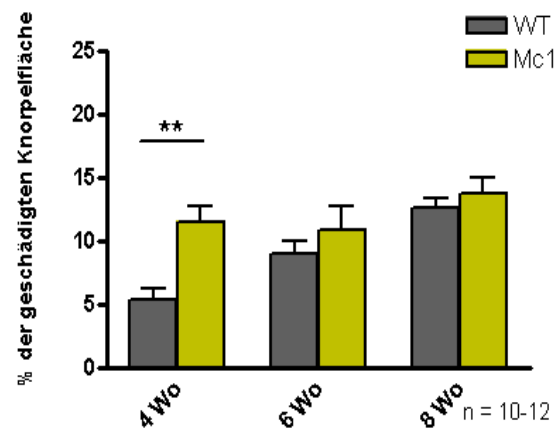
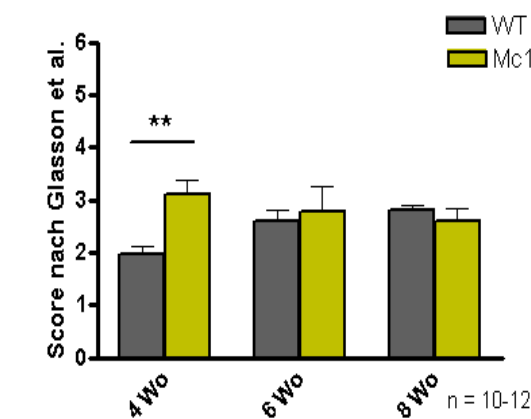
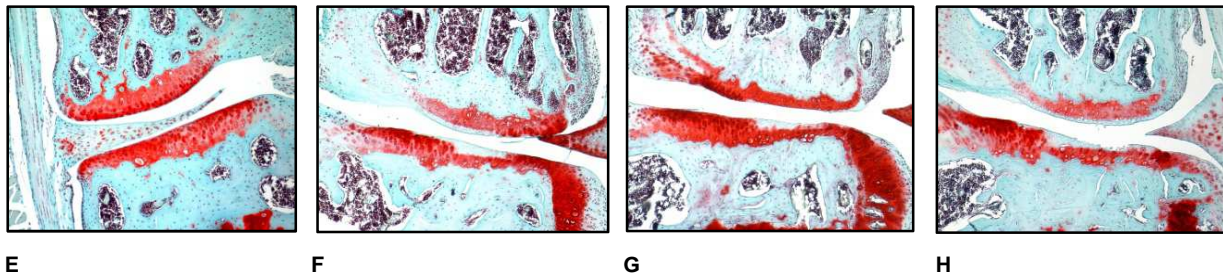


Abb. 4.13: Untersuchungen des artikulären Knorpels nach OA-Induktion in WT- und Mc1r-Mäusen.

A-H) Mediale Regionen Safranin O/Fast Green-gefärbter Paraffinschnitte muriner WT-Kniegelenke (**A-D**) bzw. Mc1r-Kniegelenke (**E-H**). Frontale Sektionen durch das linke, Sham-operierte Kniegelenk 8 Wochen nach der OP (**A**) bzw. durch das rechte, DMM-operierte Kniegelenk 4 Wochen (**B**), 6 Wochen (**C**) bzw. 8 Wochen (**D**) nach der OP (100-fache Vergrößerung).

I, J) Vergleichende Beurteilung des artikulären Knorpels von WT- und Mc1r-Mäusen im zeitlichen Verlauf der induzierten OA. **I)** Histologisches Scoring. **J)** Morphometrische Auswertung.

Die histologischen Abbildungen in Abb. 4.13 zeigen exemplarisch, dass bereits 4 Wochen nach Induktion der OA die Ausprägung bei Mc1r-Mäusen deutlich stärker erscheint als beim WT, das zell- und farblose Areal im tibialen artikulären Knorpel ist erheblich größer und auch der Farbverlust im femoralen artikulären Knorpel zeigt sich bei Mc1r-Mäusen deutlicher (B+F). Dieser Unterschied verliert sich allerdings 6 (C+G) und 8 (D+H) Wochen nach Induktion wieder.

Nach histologischer Evaluierung und statistischer Analyse lässt sich diese Beobachtung in der graphischen Darstellung bestätigen (I, J).

Im histologischen Scoring ergibt sich für die OA der Mc1r-Mäuse zum 4 Wochen-Zeitpunkt Grad 3, was einem geschädigten Areal von bis zu 25 % entspricht, während bei WT-Mäusen erst vertikale Einrisse unterhalb der Knorpeloberfläche zu erkennen sind (Grad 2).

Nach morphometrischer Auswertung beträgt die geschädigte Knorpelfläche bei Mc1r-Mäusen 4 Wochen nach OA-Induktion ca. 12 %, bei WT-Mäusen nur etwa. 5 %.

Die statistische Analyse zeigt 4 Wochen nach Induktion der OA zwischen Mc1r-Mäusen und WT einen signifikanten Unterschied in der Ausprägung der OA: die OA ist zu diesem Zeitpunkt bei den signaldefizienten Mc1r-Mäusen deutlich schwerer als bei WT-Mäusen. 6 und 8 Wochen nach Induktion der OA ist kein Unterschied mehr zu erkennen.

Deshalb ist davon auszugehen, dass die OA bei Mc1r-Mäusen im artikulären Knorpel in den ersten 4 Wochen sehr viel schwerer verläuft als beim WT, was sich im weiteren Verlauf wieder ausgleicht.

Um zu untersuchen, ob sich bei Mc1r-Mäusen ein Geschlechtsdimorphismus im Verlauf der OA zeigt, wurde der artikuläre Knorpel osteoarthrotischer Kniegelenke von männlichen und weiblichen Mc1r-Mäusen vergleichend dargestellt (sh. Abb. 4.14).

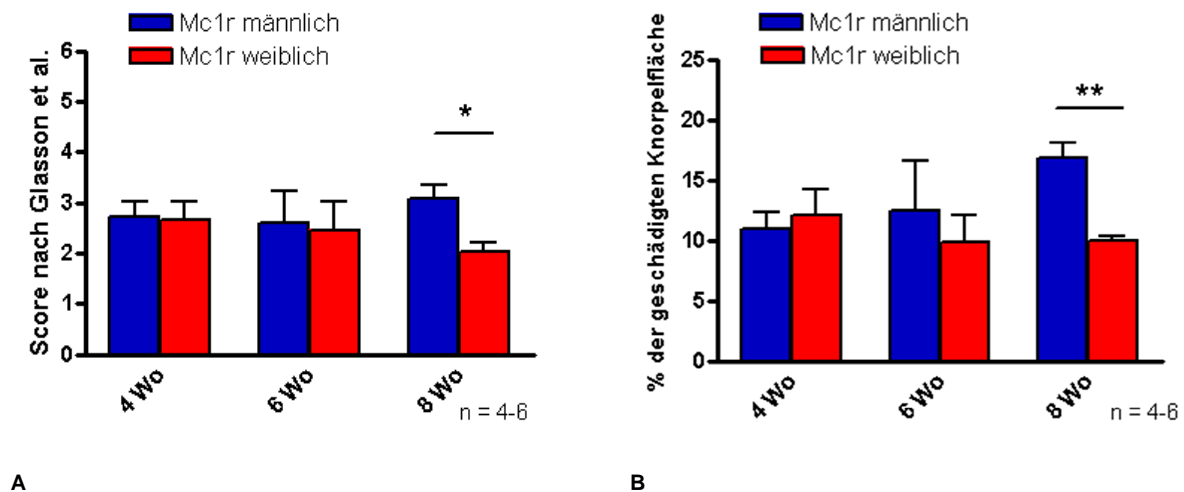


Abb. 4.14: Beurteilung geschlechtsspezifischer Unterschiede in der OA-Entwicklung bei Mc1r-Mäusen.
A) Histologisches Scoring. **B)** Morphometrische Auswertung.

Wie in Abb. 4.14 zu sehen ist, lässt sich 4 und 6 Wochen nach Induktion der OA kein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Mc1r-Mäusen erkennen. 8 Wochen nach Induktion ist die Ausprägung der OA im histologischen Scoring bei männlichen Mäusen signifikant schwerer als bei weiblichen, was in der morphometrischen Auswertung noch deutlicher wird.

Im histologischen Scoring zeigen männliche Mc1r-Mäuse 8 Wochen nach Induktion Einrisse, Safranin O-Farbverlust und Zellverlust bei bis zu 25 % der Gesamtknorpelfläche, was mit Grad 3 bewertet wird, während sich bei weiblichen Tieren erst vertikale Einrisse direkt unterhalb der Knorpeloberfläche beobachten lassen (Grad 2).

Nach morphometrischer Auswertung sind bei männlichen Mäusen ca. 18 % der Gesamtknorpelfläche beschädigt, während bei weiblichen nur etwa 10 % betroffen sind.

Da der Geschlechtsdimorphismus was die Ausprägung der OA betrifft bei den WT-Mäusen erst 12 Wochen nach Induktion der OA auftritt (Abb. 4.9), sollen in Abb. 4.15 die geschlechtsspezifischen Unterschiede zwischen WT- und Mc1r-Mäusen im direkten Vergleich dargestellt werden.

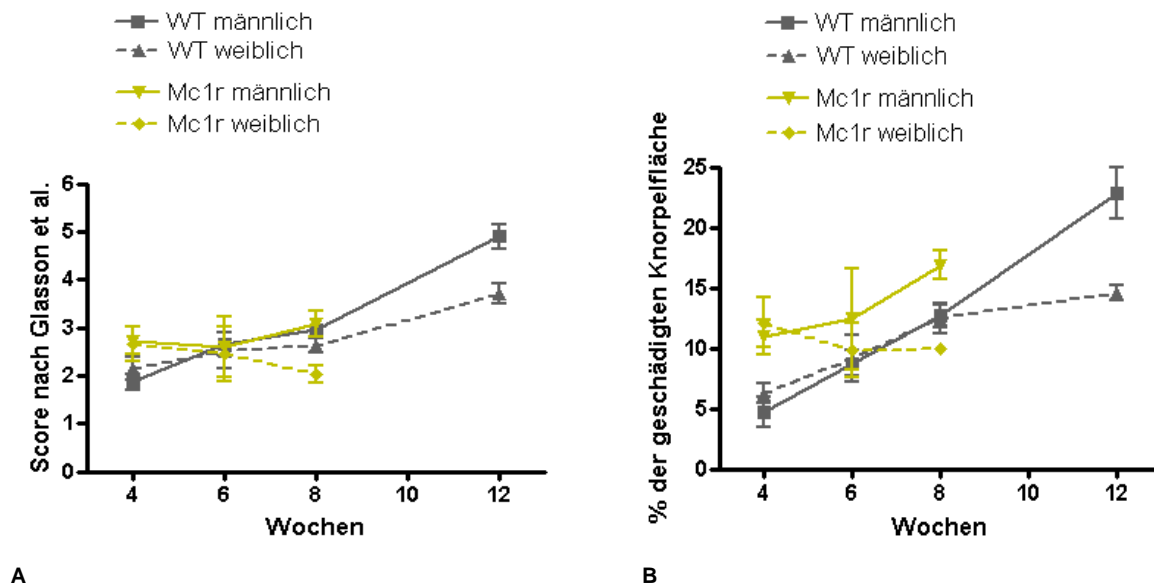


Abb. 4.15: Beurteilung geschlechtsspezifischer Unterschiede des artikulären Knorpels in der OA-Entwicklung bei WT- und Mc1r-Mäusen. **A)** Histologisches Scoring. **B)** Morphometrische Auswertung.

Wie in Abb. 4.15 zu erkennen ist, ist die OA 4 Wochen nach Induktion bei Mc1r-Mäusen deutlich schwerer als bei WT-Mäusen, hier lassen sich aber weder bei Mc1r-Mäusen noch bei WT-Mäusen geschlechtsspezifische Unterschiede beobachten.

Bei den WT-Mäusen zeigen sich bei stetigem Anstieg beider Geschlechter bis 8 Wochen nach Induktion keine geschlechtsspezifischen Unterschiede, erst 12 Wochen nach Induktion ist die OA bei den männlichen Tieren deutlich schwerer, der Anstieg bei den weiblichen Tieren wird zum 12 Wochen-Zeitpunkt hin flacher.

Bei Mc1r-Mäusen wird 6 und 8 Wochen nach Induktion vor allem nach der morphometrischen Auswertung deutlich, dass die Knorpelschäden bei männlichen Tieren weiter fortgeschritten sind, während die der weiblichen eher auf einem Level bleiben und sich denen der WT-Mäuse angleichen.

Die in der Literatur beschriebenen geschlechtsspezifischen Unterschiede sind bei beiden Stämmen zu beobachten, treten aber bei Mc1r-Mäusen früher auf als bei WT-Mäusen.

4.2.2.2 BEOBACHTUNGEN IN DER SKP

Um zu untersuchen, ob auch die Mc1r-Mäuse Veränderungen in der SKP nach Induktion einer OA aufweisen, wurde die Fläche der SKP nach OA-Induktion mithilfe einer morphometrischen Auswertung bestimmt und statistisch analysiert (Abb. 4.16). Die SKP Sham-operierter Kniegelenke zeigt in Mc1r-Mäusen im Gegensatz zu WT-Mäusen keine

geschlechtsspezifischen Unterschiede. Vergleichbar zum WT wurden die Veränderungen der SKP während einer OA getrenntgeschlechtlich bestimmt.

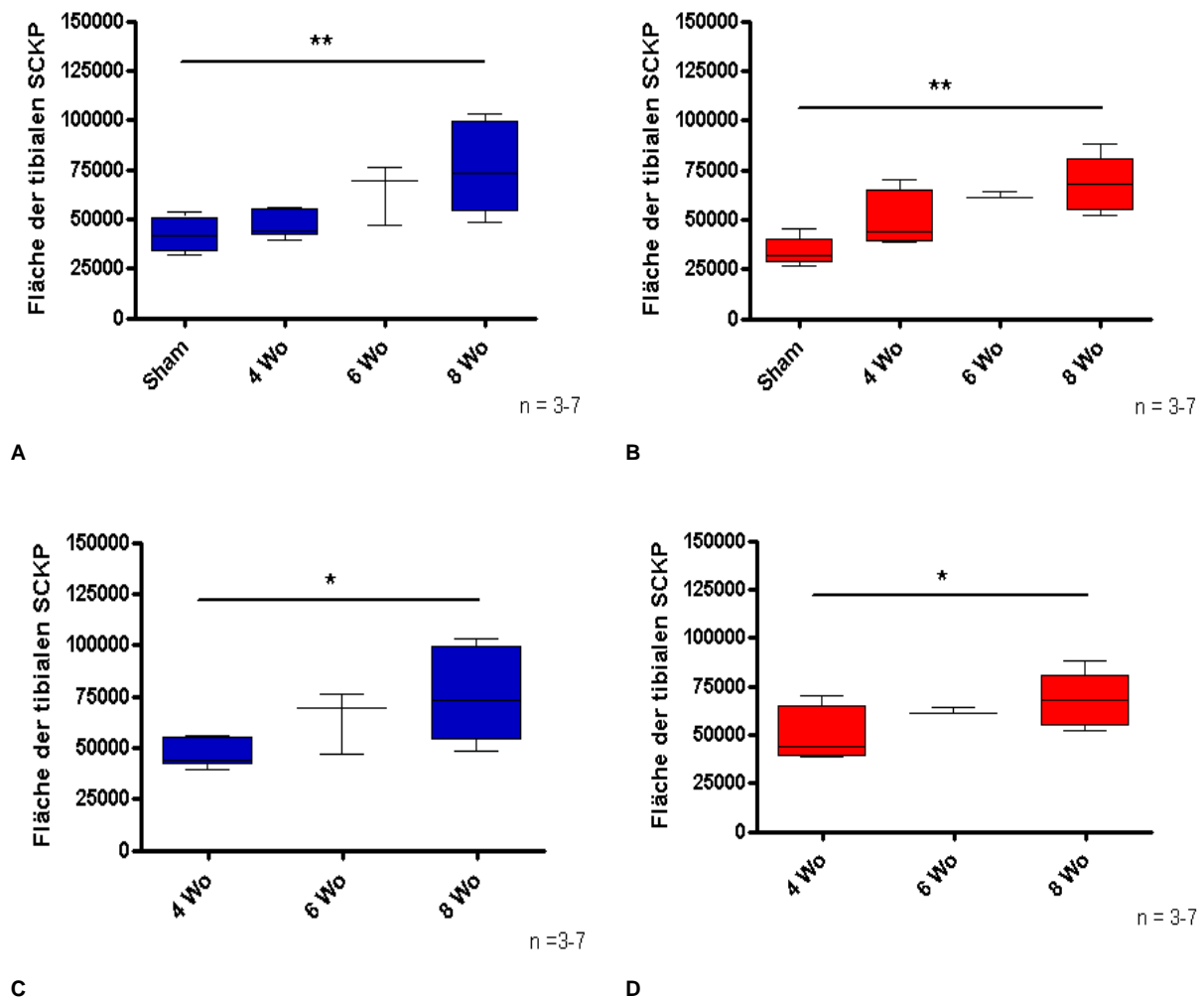


Abb. 4.16: Untersuchungen der SKP nach OA-Induktion in Mc1r-Mäusen.

Vergleichende Beurteilung der SKP im Verlauf einer OA in Bezug zur Sham-operierten Kontrolle (**A, B**) bzw. im zeitlichen Verlauf (**C, D**) bei männlichen (**A, C**) bzw. weiblichen (**B, D**) Mc1r-Mäusen.

Abb. 4.16 zeigt die Veränderungen der SKP bei männlichen und weiblichen Mc1r-Mäusen während der Entwicklung einer OA. In Bezug zur Sham-operierten Kontrolle zeigt sich bei beiden Geschlechtern eine tendenzielle Größenzunahme der SKP im Verlauf der OA, die 8 Wochen nach OA-Induktion hoch signifikant ist (**A, B**). Weder bei männlichen noch bei weiblichen Mc1r-Mäusen lässt sich ein deutlicher treppenförmiger Anstieg in der OA-Ausprägung erkennen, nur die Veränderung von 4 zu 8 Wochen nach OA-Induktion ist signifikant (**C, D**).

Um zu untersuchen, ob sich bei Mc1r-Mäusen im Verlauf einer OA ein Geschlechtsdimorphismus einstellt, sind die Veränderungen der SKP männlicher und weiblicher Mc1r-Mäuse in Abb. 4.17 im direkten Vergleich dargestellt.

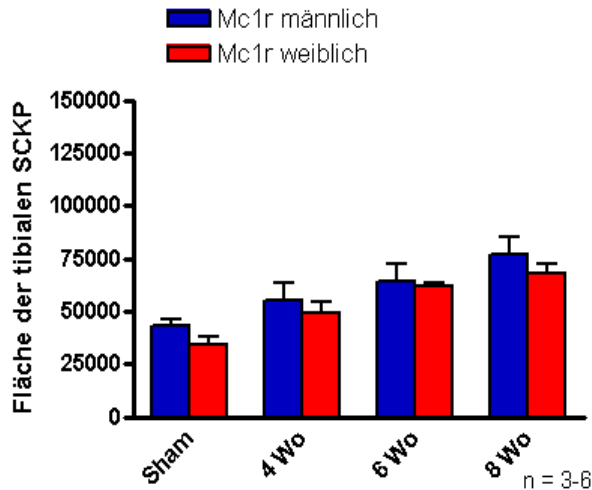


Abb. 4.17: Beurteilung geschlechtsspezifischer Unterschiede der SKP in der OA-Entwicklung bei Mc1r-Mäusen.

Abb. 4.17 lässt erkennen, dass Mc1r-Mäuse weder in der gesunden SKP noch in osteoarthrotisch veränderten SKPs einen Geschlechtsdimorphismus aufweisen. Die Verdickung der SKP im Verlauf der OA schreitet sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Mc1r-Mäusen sehr langsam fort.

Im direkten Vergleich zwischen WT- und Mc1r-Mäusen hinsichtlich der Veränderungen der SKP im Verlauf einer OA zeigt sich, dass WT-Mäuse einen deutlichen Geschlechtsdimorphismus aufweisen, der bei Mc1r-Mäusen nicht zu sehen ist (Abb. 4.18). Sowohl 4, 6 und 8 Wochen nach OA-Induktion ist die Fläche der SKP männlicher WT-Mäuse größer als die weiblicher WT-Mäuse. Dieser Geschlechtsdimorphismus lässt sich in Kniegelenken von Mc1r-Mäusen nicht beobachten. Außerdem weisen männliche WT-Mäuse zu jedem Zeitpunkt eine größere Fläche der SKP auf als männliche Mc1r-Mäuse.

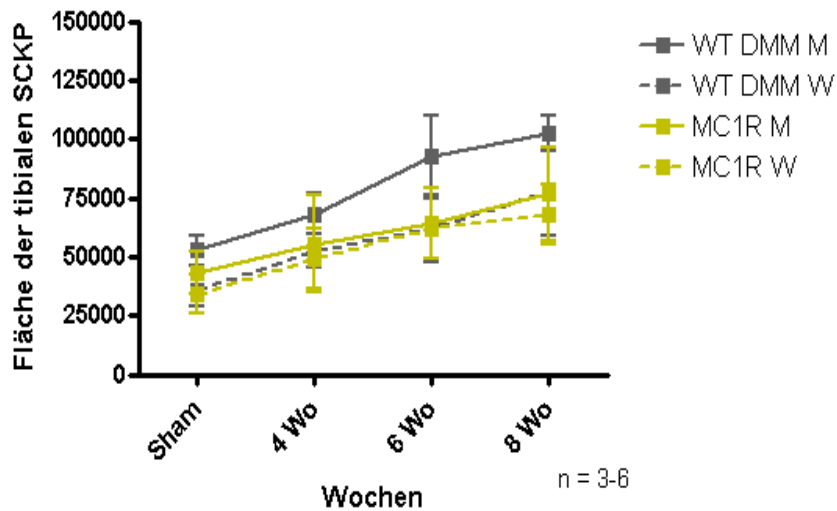


Abb. 4.18: Beurteilung geschlechtsspezifischer Unterschiede der SKP in der OA-Entwicklung bei WT- und Mc1r-Mäusen.

Im Gegensatz zum WT weisen Mc1r-Mäuse wie bereits bei Sham-operierten Kniegelenken beobachtet auch während der Entwicklung der OA keinen Geschlechtsdimorphismus hinsichtlich der Größe der SKP auf. Ohne den Einfluss weiblicher Geschlechtshormone ist die SKP sowohl mit als auch ohne OA-Induktion bei Mc1r-Mäusen kleiner als bei WT-Mäusen. Das bedeutet, dass MC-1R-Signalwege eine Rolle im Zusammenhang mit der Flächengröße der SKP spielen und außerdem diesbezüglich Einfluss auf den Geschlechtsdimorphismus nehmen.

5. DISKUSSION

Durch die vorliegenden Ergebnisse konnte ein Einfluss des MC-1R-Signalwegs auf den Verlauf einer OA im artikulären Knorpel bestätigt werden. In den signaldefizienten Mäusen zeigten sich im Initialstadium einer chirurgisch induzierten OA schwerere Knorpelschäden als beim WT. Außerdem wiesen Mc1r-Mäuse Unterschiede im Geschlechtsdimorphismus auf, der sich im Verlauf einer OA im artikulären Knorpel zeigt: die geschlechtsspezifischen Unterschiede wurden früher sichtbar als beim WT.

Während der WT sowohl in gesunden als auch in osteoarthrotischen Kniegelenken in der Flächengröße der SKP geschlechtsspezifische Unterschiede aufweist, sind bei Mc1r-Mäusen keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern zu erkennen. Die MC-1R-Signalwege nehmen außerdem geschlechtsunabhängig Einfluss auf die Flächengröße der SKP: die Fläche der SKP männlicher WT-Mäuse ist in Kniegelenken mit oder ohne OA größer als die männlicher Mc1r-Mäuse.

5.1 DMM LÖST EINE MILDE BIS MODERATE OSTEOARTHROSE AUS

Nachdem festgestellt wurde, dass sich gesunde Kniegelenke der signaldefizienten Mäuse in Struktur und Zusammensetzung der Hauptbestandteile des artikulären Knorpels nicht vom WT unterscheiden, sollte die Rolle des MC-1R-Signalwegs im Verlauf einer OA untersucht werden. Die Induktion der OA erfolgte durch die DMM, wodurch beim WT eine milde bis moderate OA entstand, die bei Betrachtung des artikulären Knorpelschadens einen langsam fortschreitenden Verlauf aufwies (Abb. 4.8).

Chirurgische OA-Modelle bei Mäusen wurden bis vor kurzem aufgrund der technischen Herausforderung und der möglichen nicht kontrollierbaren Verletzungen umliegender Gewebestrukturen vermieden (106, 107). Inzwischen sind diese Methoden aufgrund mikrochirurgischer Techniken auch bei Mäusen etabliert. Schneller Krankheitseintritt, weniger Variabilität und verminderte Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund sind die wichtigsten Vorzüge gegenüber Modellen mit spontaner OA, bei der sich die OA erst im Alter von 9-12 Monaten und in bestimmten Mausstämmen bevorzugt entwickelt (65). Die DMM wird als ideales chirurgisches OA-Modell für *in vivo*-Studien beschrieben, das einen milden bis moderaten, langsam fortschreitenden Verlauf der Erkrankung auslöst, der dem einer natürlich auftretenden OA beim Menschen entspricht (64).

Um den Einfluss von MC-1R auf die natürliche auftretende OA nachzustellen, wurde bei den WT- und bei den Mc1r-Mäusen eine DMM durchgeführt. Da sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen der mediale Bereich des Kniegelenks verstärkt degenerativen Veränderungen unterliegt, wurde nur die mediale Region betrachtet (16, 105). Die DMM rief wie in der Literatur beschrieben eine milde bis moderate OA hervor, deren Läsionen sich auf die zentralen belasteten Bereiche des medialen Femurkondylus (MFK) und des medialen Tibiaplateaus (MTP) konzentrierten (Abb. 4.8 und Abb. 4.12) (68). Auch die in der Literatur dargestellte Steigerung im Zeitverlauf konnte bei WT-Mäusen über 4, 6 und 8 Wochen beobachtet werden.

Diese Effekte entsprechen denen einer natürlich auftretenden spontanen OA und ähneln somit denen einer humanen idiopathischen OA, die durch einen langsam fortschreitenden Krankheitsverlauf gekennzeichnet ist (64, 65).

Im Verlauf dieser Doktorarbeit konnte die OA-Induktion durch die DMM reproduzierbar und wie in der Literatur beschrieben in der Experimentellen Orthopädie der Universität Regensburg etabliert werden.

5.2 MC-1R-SIGNALWEG NIMMT IM INITIALSTADIUM DER OSTEOARTHROSE EINFLUSS AUF DEN ARTIKULÄREN KNORPEL

Nach Etablierung der DMM zur Induktion einer OA wurde der Einfluss des MC-1R-Signalwegs auf die Veränderungen im artikulären Knorpel während einer OA untersucht. 4 Wochen nach Induktion der OA zeigten sich weder bei Mc1r- noch bei WT-Mäusen geschlechtsspezifische Unterschiede (Abb. 4.9, 4.14). Die OA-Ausprägung von Mc1r-Mäusen war aber zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zum WT signifikant erhöht (Abb. 4.13). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass sich die OA geschlechtsunabhängig bei Mc1r-Mäusen schneller entwickelt als bei WT-Mäusen. Der fehlende MC-1R-Signalweg in den signaldefizienten Mäusen scheint also einen negativen Einfluss auf die frühe Phase der OA zu haben.

Im frühen Stadium der OA spielen Entzündungsvorgänge eine große Rolle. Es kommt zu einer Synovitis, die durch mononukleäre Zellinfiltration und Produktion proinflammatorischer Zytokine und knorpelabbauender Proteinasen gekennzeichnet ist (49). Auch Chondrozyten setzen proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF frei. Außerdem reagieren sie auf diese Mediatoren durch vermehrte Synthese von Prostaglandinen, NO und Proteinasen (50). Zu diesen Proteinasen zählen Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Aggrecanasen, die für den Kollagen- und Proteoglykanabbau im Knorpel verantwortlich sind (51, 52). Diese

Entzündungsvorgänge führen also im Initialstadium der OA zu vermehrter Knorpeldegradation, was die OA beschleunigt.

Melanocortine spielen eine Rolle bei Entzündungsvorgängen, vor allem α -MSH zeigt protektives und anti-inflammatorisches Potential: *in vitro* nimmt es Einfluss auf molekulare Abläufe in Zusammenhang mit der Inflammation, *in vivo* konnten entzündungshemmende Effekte auf Fieber, Dermatitis, Vaskulitis und andere entzündliche Erkrankungen nachgewiesen werden (71). Einen Großteil dieser anti-inflammatorischen Effekte vermittelt α -MSH über den MC-1R (71). Es wurde allerdings in Studien mit signaldefizienten MC-1R-Mäusen belegt, dass α -MSH nach Applikation trotz fehlendem MC-1R-Signalweg anti-inflammatorisches Potential einnehmen kann (108, 109). Das injizierte Peptid könnte aber bei signaldefizientem MC-1R auch über andere Rezeptoren anti-inflammatorisch wirken. α -MSH stellt zum Beispiel den bevorzugten Liganden für den MC-5R dar, der in einer Vielzahl von Geweben exprimiert wird. Weiterführende Untersuchungen zur anti-inflammatorischen Wirkung des MC-5R-Signalwegs, wie OA-Induktion in MC-5R-signaldefizienten Mäusen, würden hier Aufschluss geben. Außerdem wurde im Zusammenhang mit experimentell induzierten entzündlichen Darmerkrankungen von signifikant erhöhten inflammatorischen Antworten in signaldefizienten Mc1r-Mäusen berichtet, was dafür spricht, dass der MC-1R für die Vermittlung des anti-inflammatorischen Potentials verantwortlich ist (110).

Auch im osteoartikulären System nimmt α -MSH Einfluss auf Entzündungsvorgänge: *in vitro* wurde von einem Einfluss auf die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und MMPs in artikulären Chondrozyten humaner osteoarthrotischer Kniegelenke und in einer Chondrosarkoma-Zelllinie berichtet (82, 111). *In vivo* kann das Neurohormon sowohl in Mäusen als auch in Ratten die Symptome einer experimentell induzierten Arthritis herabsetzen (89, 90).

Die vorliegenden Ergebnisse belegen einen Effekt des MC-1R-Signalwegs in der frühen Phase der OA, in der die Inflammation eine wichtige Rolle spielt. Da das anti-inflammatorische Potential des MC-1R-Signalwegs in den signaldefizienten Mäusen nicht vermittelt werden kann, vermuten wir, dass die Inflammation in diesen Mäusen in der frühen Phase der OA verstärkt ist. Dadurch könnte es zu vermehrter Produktion proinflammatorischer Zytokine und knorpeldegradierender Enzyme kommen, so dass die Erkrankung schneller fortschreitet.

Der MC-1R-Signalweg könnte also im Initialstadium einer OA anti-inflammatorisch wirken, so dass osteoarthrotische Schäden hinausgezögert werden. Das impliziert eine chondroprotektive Rolle des MC-1R-Signalwegs im Verlauf einer OA.

5.3 MC-1R-SIGNALWEG NIMMT IM VERLAUF EINER OSTEOARHTROSE EINFLUSS AUF DEN GESCHLECHTSDIMORPHISMUS IM ARTIKULÄREN KNORPEL

Im weiteren Zeitverlauf der induzierten OA zeigten sowohl WT- als auch Mc1r-Mäuse einen deutlichen Geschlechtsdimorphismus den artikulären Knorpel betreffend (Abb. 4.15). Bei WT-Mäusen verstärkte sich die OA-Ausprägung beider Geschlechter bis zum 8 Wochen-Zeitpunkt stetig, beim 12 Wochen-Zeitpunkt wies die OA männlicher Tieren gegenüber weiblichen einen höheren Schweregrad auf (Abb. 4.9). Bei Mc1r-Mäusen war die verstärkte Ausprägung der OA bei männlichen Tieren schon nach 6 Wochen zu sehen, nach 8 Wochen war sie gegenüber der weiblicher Tiere signifikant (Abb. 4.14). Bei weiblichen Mc1r-Mäusen wurde sie 6 und 8 Wochen nach Induktion sogar schwächer als zum 4 Wochen-Zeitpunkt. Das Geschlecht zeigt also unabhängig vom MC-1R-Signalweg einen Einfluss auf den artikulären Knorpel während der Entwicklung einer OA, der Geschlechtsdimorphismus setzt aber bei Mc1r-Mäusen früher ein als bei WT-Mäusen.

Humane geschlechtsspezifische Unterschiede in der Prävalenz und in der klinischen Manifestation einer OA wurden bereits in mehreren epidemiologischen Studien nachgewiesen (25, 26). Vor einem Alter von 50 Jahren zeigen Männer eine höhere Prävalenz, nach der Menopause steigt die Inzidenz bei Frauen, bei denen dann meist mehrere Gelenke in schwerem Ausmaß betroffen sind (27-29). Welche Rolle genau die Geschlechtshormone im Verlauf einer OA spielen, ist noch unklar. In verschiedenen Studien konnte aber eine Korrelation zwischen Östrogen und OA nachgewiesen werden. So zeigten sowohl ovariectomierte Ratten als auch ovariectomierte Mäuse, die kein Östrogen mehr produzieren, signifikant schwerere Knorpelschäden als weibliche unkastrierte Kontrolltiere (34, 112, 113). Das impliziert eine chondroprotektive Rolle von Östrogen, die mit der Beobachtung übereinstimmt, dass Frauen nach der Menopause, also bei fehlendem Einfluss weiblicher Geschlechtshormone, eine schwerere OA entwickeln.

Es wird außerdem von verschiedenen Mausmodellen berichtet, in denen männliche Mäuse mehr Knorpelschäden im Verlauf einer OA entwickeln als weibliche. Sowohl bei spontaner OA, als auch bei Kollagenase-induzierter und chirurgisch induzierter OA mittels DMM konnten diese Effekte gezeigt werden (30-34). Zu welchem Zeitpunkt der Geschlechtsdimorphismus auftritt, ist dabei abhängig von Stamm und Art der OA-Induktion (34).

So sind bei 129S6/SvEv-Mäusen, die einer DMM unterzogen wurden, erstmals 4 Wochen nach Induktion signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede im artikulären Knorpel zu beobachten, während bei C57Bl/6-Mäusen in der vorliegenden Studie erst 12 Wochen nach OA-Induktion per DMM signifikant schwerere Knorpelschäden bei männlichen Tieren gezeigt werden konnten (Abb. 4.9) (34). In einem Kollagenase-induzierten OA-Modell bei C57Bl/6-

Mäusen wiederum konnten bereits 6 Wochen nach Induktion signifikante Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren beobachtet werden (33). Bei Mc1r-Mäusen zeigten sich in der vorliegenden Studie 8 Wochen nach OA-Induktion durch DMM signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede (Abb. 4.14).

Der Geschlechtsdimorphismus nach OA-Induktion durch DMM ist also im artikulären Knorpel bei MC-1R-signaldefizienten Mäusen früher (8 Wochen nach OA-Induktion) als bei WT-Mäusen zu beobachten (12 Wochen nach OA-Induktion). Die Mc1r-Mäuse unterscheiden sich vom WT nur durch den signaldefizienten MC-1R. Das lässt darauf schließen, dass der MC-1R-Signalweg Einfluss auf die Östrogen-Wirkung im Verlauf einer OA hat. Offensichtlich setzt der vermutete chondroprotektive Effekt von Östrogen ohne MC-1R früher ein, möglicherweise um die fehlende, hier postulierte chondroprotektive Rolle des MC-1R-Signalwegs zu kompensieren. Neben dem hier beobachteten osteoartikulären Zusammenhang zwischen MC-1R und Östrogen wurde von einer weiteren Korrelation berichtet: nach subkutaner Applikation von Östrogen in Mc1r-Mäusen ist die Pigmentation der Haare in weiblichen Mc1r-Mäusen im Vergleich zum WT erhöht (114). Der MC-1R-Signalweg scheint also Einfluss auf den Östrogen-Stoffwechsel und/oder dessen Wirkung zu nehmen.

5.4 MC-1R-SIGNALWEG NIMMT EINFLUSS AUF DIE SKP

Eine OA zeichnet sich nicht nur durch eine Zerstörung des artikulären Knorpels aus, auch die SKP verändert sich im Verlauf der Erkrankung. Nach wie vor ist unklar, ob bei einer OA zuerst die Veränderungen des artikulären Knorpels oder die der SKP auftreten, in einem Tiermodell mit spontaner OA konnten aber erstmals Veränderungen der SKP vor Eintreten der Knorpeldegeneration nachgewiesen werden (115).

Da die OA beim Menschen meist erst spät diagnostiziert wird, können kaum Aussagen über den longitudinalen Verlauf der subchondralen Veränderungen getroffen werden. Es ist aber bekannt, dass es in frühen Phasen der OA zu einem Umbau der Region zwischen Knorpel und Knochen kommt und dass sich später die SKP durch Volumenzunahme des Knochens verdickt. Außerdem können Knorpeldefekte die Dichte des subchondralen Knochens beeinflussen (116). Neben der Verdickung der SKP können andere pathologische Prozesse wie Einrisse, Ödeme, Blutungen oder Zysten beobachtet werden (16). Später kommt es zur Deformation der SKP durch erhöhte metabolische Aktivität und Mikrofrakturen, was zu einem Zusammenbruch der knöchernen Architektur führt. Dadurch kommt es zu einem Verlust der Gelenkkongruenz, wodurch die OA weiter fortschreitet (46).

In verschiedenen Tiermodellen konnte nach Induktion der OA anfangs eine Verdünnung der SKP beobachtet werden. So wurde bei Mäusen, die nach OA-Induktion per Kollagenase-

Injektion *in vivo* einer longitudinalen mikrofokalen Computertomographie-Studie (μ CT) unterzogen wurden, zu Beginn der OA eine verdünnte und poröse SKP entdeckt (56). Auch in Ratten konnte nach chemischer oder chirurgischer OA-Induktion bei *in vivo* μ CT-Studien anfänglicher Knochenverlust beobachtet werden (117, 118). Auch durch histomorphometrische Untersuchungen bei einem chirurgisch induzierten OA-Modell in Ratten konnte in der frühen Phase der Erkrankung ein subchondraler Knochenverlust bestätigt werden (119).

Im weiteren Verlauf der OA allerdings wurde die SKP bei allen Studien dichter und steifer und zeigte eine signifikante Verdickung im Vergleich zur Kontrolle. Auch bei humaner OA zeigt sich eine subchondrale Sklerosierung im Endstadium einer OA (120).

Die anfängliche Verdünnung der SKP kann vermutlich auf eine erhöhte Osteoklasten-Aktivität zurückgeführt werden, die dann von einer Reparaturphase durch eine gesteigerte Osteoblasten-Aktivität abgelöst wird (56). Der Knochenumbau im Verlauf einer OA scheint also ein biphasisches Phänomen zu sein, das erst durch Abnahme, dann durch Zunahme des Knochenvolumens gekennzeichnet ist (120). Auch beim Menschen konnte kürzlich erstmals eine Abnahme des Knochenvolumens in der frühen Phase der OA nachgewiesen werden, die diese Theorie unterstützt (121).

In der vorliegenden Studie wurde die tibiale SKP in der medialen Region gesunder und osteoarthrotischer Kniegelenke von WT- und Mc1r-Mäusen untersucht. WT-Mäuse wiesen zu jedem Zeitpunkt einen deutlichen Geschlechtsdimorphismus auf: die SKP männlicher WT-Mäuse war im Vergleich zur SKP weiblicher WT-Mäuse verdickt (Abb. 4.11). Dieser Geschlechtsdimorphismus war bei Mc1r-Mäusen weder in gesunden noch in osteoarthrotischen Kniegelenken zu beobachten, was für einen Zusammenhang von MC-1R-Signalwegen und Geschlechtshormonen spricht (Abb. 4.17). Bereits im artikulären Knorpel wurden während der Entwicklung einer OA Unterschiede im Geschlechtsdimorphismus zwischen Mc1r-Mäusen und WT-Mäusen beschrieben (siehe 5.3). Hier scheint der implizierte chondroprotektive Effekt von Östrogen bei Mc1r-Mäusen früher einzusetzen. Da sich die Mc1r-Mäuse auch was die SKP betrifft im Geschlechtsdimorphismus von den WT-Mäusen unterscheiden, ist auch an dieser Stelle ein Zusammenhang von Östrogen und MC-1R-Signalwegen wahrscheinlich.

Um während der Entwicklung der OA den vermuteten Einfluss von Östrogen in Mc1r-Mäusen außer Acht zu lassen, wird weiterhin nur auf die SKP männlicher Tiere eingegangen.

Die in der Literatur beschriebene anfängliche Verdünnung der SKP während der Entwicklung einer OA konnte weder bei WT-Mäusen noch bei Mc1r-Mäusen nach histomorphometrischer Auswertung gezeigt werden (56, 117-119). Diese Beobachtung ließe sich möglicherweise zu einem früheren Zeitpunkt nach Induktion der OA machen (die histomorphometrische

Auswertung von Kniegelenken, die 2 Wochen nach Induktion der OA entnommen wurden, wird bereits in der Experimentellen Orthopädie Regensburg bearbeitet). Die Verdickung der SKP, die im weiteren Verlauf der OA auftritt, war sowohl bei WT-Mäusen als auch bei Mc1r-Mäusen zu sehen (Abb. 4.10, 4.16). Die SKP war beim WT bereits 4 Wochen nach Induktion der OA signifikant verdickt und nahm im Krankheitsverlauf weiter zu. Bei Mc1r-Mäusen schritt die Zunahme der SKP langsamer fort: sie wurde erst 8 Wochen nach OA-Induktion signifikant. Die SKP zeigte zwar eine Verdickung im Vergleich zur Kontrolle, war aber zu jedem Zeitpunkt weniger dick als die von WT-Mäusen (Abb. 4.10, Abb. 4.18). Auch in gesunden Kniegelenken war die SKP männlicher WT-Mäuse dicker als die männlicher Mc1r-Mäuse. Das impliziert einen Zusammenhang zwischen MC-1R-Signalwegen und Knochenstoffwechsel. Der MC-1R konnte bereits wie alle anderen MC-Rs auf Knochenzellen nachgewiesen werden (88). In Primärkulturen mit Ratten-Osteoblasten steigert α -MSH die Proliferation dieser Zellen (96). In Mc1r-Mäusen könnte diese Wirkung aufgrund des signaldefizienten Rezeptors herabgesetzt sein, so dass weniger Osteoblasten gebildet werden. Dies könnte die kleinere SKP bei Mc1r-Mäusen erklären. In derselben Studie konnte gezeigt werden, dass durch systemische Applikation von α -MSH bei Mäusen die Anzahl der tibialen Trabekel im subchondralen Knochen vermindert wird (96). Wenn die Trabekel verschwinden, verdickt sich die SKP, da sich das Knochenvolumen zwischen Knorpel und Wachstumsfuge erhöht. Das könnte bedeuten, dass bei fehlender Wirkung von α -MSH in Mc1r-Mäusen mehr Trabekel vorhanden sind, so dass die SKP weniger dick ist. Auch die Knochenresorption wird durch α -MSH inhibiert (122). Wenn die Wirkung von α -MSH wie in den Mc1r-Mäusen nicht vermittelt werden kann, könnte das eine vermehrte Resorption nach sich ziehen, was wiederum in einer weniger dicken SKP resultieren würde.

Um diese Hypothesen genauer zu untersuchen, müsste die Knochenstruktur und –zusammensetzung dieser signaldefizienten Tiere genauer analysiert werden. Hierfür eignen sich zum Beispiel *in vivo* μ CT-Studien, die bereits in einer Kollaboration mit der Experimentellen Orthopädie des Universitätsklinikums Heidelberg begonnen wurden.

5.5 FAZIT UND AUSBLICK

In der vorliegenden Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass der MC-1R-Signalweg *in vivo* einen Einfluss auf den Verlauf einer OA hat. In signaldefizienten Tieren kommt es zu verstärkten osteoarthrotischen Veränderungen im artikulären Knorpel. Das impliziert einen chondroprotektiven Effekt vom MC-1R-Signalweg im Verlauf einer OA. Außerdem zeigt sich sowohl in gesunden als auch in osteoarthrotischen Kniegelenken im Vergleich zum WT eine dünnere tibiale SKP. Das lässt einen Einfluss des Signalwegs auf den Knochenstoffwechsel vermuten. Des Weiteren setzt bei Mc1r-Mäusen der Geschlechtsdimorphismus, der sich

durch eine verstärkte OA im artikulären Knorpel männlicher Tiere ausgezeichnet, früher ein als bei WT-Mäusen, so dass ein Zusammenhang zwischen MC-1R-Signalweg und Östrogenstoffwechsel postuliert werden kann. Für solch einen Zusammenhang spricht auch die Beobachtung, dass WT-Mäuse was die Fläche der tibialen SKP angeht einen Geschlechtsdimorphismus aufweisen, der bei Mc1r-Mäusen fehlt.

In zukünftigen Studien sollte untersucht werden, ob sich die Mc1r-Mäuse in Knochenstruktur und –zusammensetzung von den WT-Mäusen unterscheiden. Dabei könnten μ CT-Analysen Aufschluss geben, die Aussagen über die SKP, Trabekel, Knochenmark und Perforationen in der SKP treffen ließen. Eine solche longitudinale *in vivo* μ CT-Studie wurde in Kollaboration mit der Experimentellen Orthopädie der Universität Heidelberg während dieser Arbeit begonnen. Mit Hilfe dieser Untersuchungen können neben der Charakterisierung des gesunden Knochens von Mc1r-Mäusen auch die Veränderungen der SKP im Verlauf einer OA analysiert werden.

Des Weiteren wird derzeit in der Experimentellen Orthopädie Regensburg die Ausprägung der OA bei Mc1r-Mäusen zu einem früheren Zeitpunkt (2 Wochen nach Induktion der OA) untersucht, um festzustellen, ob bereits hier eine schwerere OA im Vergleich zum WT beobachtet werden kann. Das würde die Hypothese des chondroprotektiven Effektes des MC-1R-Signalwegs durch dessen anti-inflammatorische Wirkung in der frühen Phase der OA unterstützen. Außerdem könnte zu einem früheren Zeitpunkt die mehrfach beschriebene anfängliche Verdünnung der SKP im Verlauf einer OA gezeigt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Osteoarthrose (OA) ist die häufigste Form der Arthritis, fast immer verbunden mit chronischen Schmerzen. Die Ätiologie der OA ist multifaktoriell bedingt und noch nicht vollständig bekannt. Studien belegen, dass Melanocortine eine Rolle im Knochen- und Knorpelstoffwechsel und bei entzündlichen und degenerativen Gelenkserkrankungen spielen (3). Vor allem α -MSH ist in Verbindung mit dem MC-1R für sein anti-inflammatorisches Potential bekannt (71). In dieser Studie sollte die Rolle von Melanocortinen im Verlauf einer OA *in vivo* untersucht werden.

Um die Rolle des MC-1R-Signalwegs während der Entwicklung einer OA zu untersuchen, wurde *in vivo* an WT-Mäusen und signaldefizienten Mc1r-Mäusen beider Geschlechter eine OA chirurgisch induziert. Hierfür wurde das Kniegelenk durch Inzision des medialen meniskotibialen Ligaments destabilisiert, als Kontrolle wurden Kniegelenke, bei denen das Ligament durch eine Sham-OP dargestellt, aber nicht durchtrennt wurde, verwendet (68). Um den Grad der fortschreitenden OA zu messen, wurden die Kniegelenke 4, 6 und 8 Wochen nach OA-Induktion entnommen und histologisch auf osteoarthrotische Veränderungen und geschlechtsspezifische Unterschiede hin untersucht. Dazu wurden je fünf Paraffinschnitte im Abstand von 80 μ m mit Safranin O/Fast Green gefärbt. Veränderungen des artikulären Knorpels und der SKP (SKP) wurden durch ein histologisches Scoring-System bzw. durch eine morphometrische Analyse ausgewertet (10).

In gesunden Kniegelenken zeigt sich bezüglich der Hauptbestandteile des artikulären Knorpels kein Unterschied zwischen Mc1r- und WT-Mäusen. Im Verlauf einer OA konnte ein Einfluss des MC-1R Signalwegs auf die Erkrankung gefunden werden: die signaldefizienten Mäuse weisen bei einer chirurgisch induzierten OA schwerere Knorpelschäden auf als die WT-Mäuse. Außerdem setzt der Geschlechtsdimorphismus, der auf die chondroprotektive Wirkung von Östrogen im Verlauf einer OA zurückzuführen ist, bei Mc1r-Mäusen früher sichtbar als bei WT-Mäusen, was einen Zusammenhang zwischen Östrogen und MC-1R-Signalwegen impliziert.

Auch was die Flächengröße der SKP anbelangt spielen MC-1R-Signalwege eine Rolle: die Fläche der tibialen SKP männlicher Mc1r-Mäuse ist sowohl in gesunden als auch in osteoarthrotischen Kniegelenken kleiner als die männlicher WT-Mäuse. Außerdem wird in diesem Zusammenhang ein weiterer Einfluss auf den Geschlechtsdimorphismus deutlich.

Bei männlichen WT-Mäusen ist in gesunden und in osteoarthrotischen Kniegelenken eine größere SKP als bei weiblichen WT-Mäusen zu beobachten, wogegen bei Mc1r-Mäusen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede sichtbar sind. Auch hier scheinen MC-1R-Signalwege mit Östrogen im Zusammenhang zu stehen.

Diese Arbeit zeigt demnach eine chondroprotektive Wirkung des MC-1R-Signalwegs während dem Verlauf einer OA, die vermutlich auf dessen anti-inflammatorische Wirkung zurückzuführen ist. Außerdem scheint der MC-1R-Signalweg den Knochenmetabolismus zu beeinflussen. Die Unterschiede im Geschlechtsdimorphismus zwischen WT- und Mc1r-Mäusen, die sich sowohl im artikulären Knorpel als auch in der SKP zeigen, sprechen zusätzlich für einen osteoartikulären Zusammenhang von Östrogen und MC-1R.

In dieser Studie konnte demnach erstmals gezeigt werden, dass der MC-1R-Signalweg das osteoartikuläre System im gesunden und im pathologisch veränderten Zustand beeinflusst.

7. SUMMARY

Osteoarthritis (OA) is the most common form of arthritis and a leading cause of chronic pain. The etiology of OA is multifactorial and still not well defined. Studies indicate that melanocortins play an important role in bone and cartilage turnover and in inflammatory degenerative arthropathies (3). Especially α -MSH is known for its anti-inflammatory potential via MC-1R pathways (71). This *in vivo* study was carried out to investigate the role of melanocortins during the development of OA.

To determine the role of MC-1R signalling during OA development, OA was surgically induced *in vivo* in male and female WT mice and MC-1R signalling deficient (Mc1r) mice. Therefore, the knee joints were destabilized by incision of the medial meniscotibial ligament, while knee joints, in which the ligament was visualized but not transected, were used as control joints (68). To examine the severity of progressing OA, knee joints were removed 4, 6 and 8 weeks after OA induction and evaluated histologically in regard to osteoarthritic changes and sex dependent differences. For this purpose, 5 frontal paraffin sections at 80 μ m intervals were stained with Safranin O and Fast Green. Changes in articular cartilage and subchondral bone plate (SBP) were evaluated by histological scoring and/or morphometric analysis (10).

Concerning the principal components of articular cartilage in non-osteoarthritic knee joints of WT and Mc1r mice, no difference can be observed. During OA-progression, MC-1R signalling influences the disease: cartilage destruction is more severe in signalling deficient mice than in WT mice. Furthermore, the sex dimorphism based on the chondroprotective effect of estrogen is shown earlier in Mc1r mice than in WT mice, suggesting a correlation between estrogen and MC-1R signalling.

MC-1R pathways also play a role regarding the dimension of the area of the SBP: the area of the tibial SBP in male MC1r mice is smaller than in male WT mice, both non-osteoarthritic and osteoarthritic knee joints. In addition, another influence on sex dimorphism can be observed in this context. Male WT mice show a bigger SBP than female WT mice in non-osteoarthritic as well as in osteoarthritic knee joints, whereas Mc1r mice do not show any sex differences. This implicates another correlation between MC-1R signalling and estrogen.

This study demonstrates chondroprotective effects of MC-1R signaling during the development of OA, probably based on the anti-inflammatory potential of MC-1R pathways. Furthermore, MC-1R signalling seems to influence bone metabolism. Because of the differences in sex dimorphism between *Mc1r* and WT mice in articular cartilage as well as in SBP area, a correlation between MC-1R and estrogen can be implicated.

In this study, effects of MC-1R signalling on the osteoarticular system in non-osteoarthritic as well as in osteoarthritic conditions could be demonstrated for the first time.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Poole CA (1997) Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *Journal of anatomy* 191 (Pt 1):1-13.
2. Poole AR, et al. (2001) Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clinical orthopaedics and related research* (391 Suppl):S26-33.
3. Bohm M & Grassel S (2012) Role of proopiomelanocortin-derived peptides and their receptors in the osteoarticular system: from basic to translational research. *Endocrine reviews* 33(4):623-651.
4. Gelse K, Poschl E, & Aigner T (2003) Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews* 55(12):1531-1546.
5. Buckwalter JA, Mankin HJ, & Grodzinsky AJ (2005) Articular cartilage and osteoarthritis. *Instructional course lectures* 54:465-480.
6. Prydz K & Dalen KT (2000) Synthesis and sorting of proteoglycans. *Journal of cell science* 113 Pt 2:193-205.
7. Bhosale AM & Richardson JB (2008) Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British medical bulletin* 87:77-95.
8. Goldring MB & Marcu KB (2009) Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy* 11(3):224.
9. Madry H, van Dijk CN, & Mueller-Gerbl M (2010) The basic science of the subchondral bone. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA* 18(4):419-433.
10. Glasson SS, Chambers MG, Van Den Berg WB, & Little CB (2010) The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 18 Suppl 3:S17-23.
11. Wiberg C, et al. (2003) Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan. *The Journal of biological chemistry* 278(39):37698-37704.
12. Eyre DR, Weis MA, & Wu JJ (2006) Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *European cells & materials* 12:57-63.
13. Brandt KD, Radin EL, Dieppe PA, & van de Putte L (2006) Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Annals of the rheumatic diseases* 65(10):1261-1264.
14. Felson DT (2006) Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *The New England journal of medicine* 354(8):841-848.
15. Lawrence RC, et al. (1998) Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis and rheumatism* 41(5):778-799.
16. Goldring MB & Goldring SR (2007) Osteoarthritis. *Journal of cellular physiology* 213(3):626-634.
17. Guilak F, et al. (2004) The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. *Clinical orthopaedics and related research* (423):17-26.
18. Pulai JI, et al. (2005) NF-kappa B mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments. *J Immunol* 174(9):5781-5788.
19. Lee JH, Fitzgerald JB, Dimicco MA, & Grodzinsky AJ (2005) Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression. *Arthritis and rheumatism* 52(8):2386-2395.

20. Valdes AM, *et al.* (2006) Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. *Arthritis and rheumatism* 54(2):533-539.
21. Kannu P, *et al.* (2010) Premature arthritis is a distinct type II collagen phenotype. *Arthritis and rheumatism* 62(5):1421-1430.
22. Baker-LePain JC & Lane NE (2010) Relationship between joint shape and the development of osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology* 22(5):538-543.
23. Loughlin J (2005) Polymorphism in signal transduction is a major route through which osteoarthritis susceptibility is acting. *Current opinion in rheumatology* 17(5):629-633.
24. Valdes AM, *et al.* (2007) Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis and rheumatism* 56(1):137-146.
25. Hochberg MC (1991) Epidemiology of osteoarthritis: current concepts and new insights. *The Journal of rheumatology. Supplement* 27:4-6.
26. Srikanth VK, *et al.* (2005) A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 13(9):769-781.
27. Sowers M (2001) Epidemiology of risk factors for osteoarthritis: systemic factors. *Current opinion in rheumatology* 13(5):447-451.
28. Davis MA (1988) Epidemiology of osteoarthritis. *Clinics in geriatric medicine* 4(2):241-255.
29. Cicuttini FM & Spector TD (1995) Osteoarthritis in the aged. Epidemiological issues and optimal management. *Drugs & aging* 6(5):409-420.
30. Sokoloff L (1956) Natural history of degenerative joint disease in small laboratory animals. I. Pathological anatomy of degenerative joint disease in mice. *A.M.A. archives of pathology* 62(2):118-128.
31. Silberberg M & Silberberg R (1963) Role of sex hormone in the pathogenesis of osteoarthritis of mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 12:285-289.
32. Silberberg M & Silberberg R (1963) Modifying action of estrogen on the evolution of osteoarthritis in mice of different ages. *Endocrinology* 72:449-451.
33. van Osch GJ, van der Kraan PM, Vitters EL, Blankevoort L, & van den Berg WB (1993) Induction of osteoarthritis by intra-articular injection of collagenase in mice. Strain and sex related differences. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 1(3):171-177.
34. Ma HL, *et al.* (2007) Osteoarthritis severity is sex dependent in a surgical mouse model. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 15(6):695-700.
35. Carrington JL (2005) Aging bone and cartilage: cross-cutting issues. *Biochemical and biophysical research communications* 328(3):700-708.
36. Loeser RF (2009) Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 17(8):971-979.
37. Martin JA, Brown TD, Heiner AD, & Buckwalter JA (2004) Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis. *Clinical orthopaedics and related research* (427 Suppl):S96-103.
38. Loeser RF (2011) Aging and osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology* 23(5):492-496.
39. Verzijl N, *et al.* (2000) Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *The Journal of biological chemistry* 275(50):39027-39031.
40. Maroudas A, Bayliss MT, Uchitel-Kaushansky N, Schneiderman R, & Gilav E (1998) Aggrecan turnover in human articular cartilage: use of aspartic acid racemization as a marker of molecular age. *Archives of biochemistry and biophysics* 350(1):61-71.
41. Aigner T, *et al.* (2006) Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 54(11):3533-3544.

42. Aigner T, Bertling W, Stoss H, Weseloh G, & von der Mark K (1993) Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *The Journal of clinical investigation* 91(3):829-837.
43. Nerlich AG, Wiest I, & von der Mark K (1993) Immunohistochemical analysis of interstitial collagens in cartilage of different stages of osteoarthritis. *Virchows Archiv. B, Cell pathology including molecular pathology* 63(4):249-255.
44. Miosge N, et al. (1998) Light and electron microscopic in-situ hybridization of collagen type I and type II mRNA in the fibrocartilaginous tissue of late-stage osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 6(4):278-285.
45. Furuzawa-Carballeda J, et al. (2012) Polymerized-type I collagen downregulates inflammation and improves clinical outcomes in patients with symptomatic knee osteoarthritis following arthroscopic lavage: a randomized, double-blind, and placebo-controlled clinical trial. *TheScientificWorldJournal* 2012:342854.
46. Pritzker KP, et al. (2006) Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 14(1):13-29.
47. von der Mark K, et al. (1992) Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis and rheumatism* 35(7):806-811.
48. Hoyland JA, et al. (1991) Distribution of type X collagen mRNA in normal and osteoarthritic human cartilage. *Bone and mineral* 15(2):151-163.
49. Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, & Bresnihan B (2005) Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 64(9):1263-1267.
50. Loeser RF (2006) Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis and rheumatism* 54(5):1357-1360.
51. Murphy G & Nagase H (2008) Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? *Nature clinical practice. Rheumatology* 4(3):128-135.
52. Cawston TE & Wilson AJ (2006) Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best practice & research. Clinical rheumatology* 20(5):983-1002.
53. Wu CW, et al. (2002) Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17(4):639-651.
54. Goldring MB & Goldring SR (2010) Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1192:230-237.
55. Hill CL, et al. (2001) Knee effusions, popliteal cysts, and synovial thickening: association with knee pain in osteoarthritis. *The Journal of rheumatology* 28(6):1330-1337.
56. Botter SM, et al. (2011) Osteoarthritis induction leads to early and temporal subchondral plate porosity in the tibial plateau of mice: an in vivo micro focal computed tomography study. *Arthritis and rheumatism* 63(9):2690-2699.
57. Buckland-Wright C (2004) Subchondral bone changes in hand and knee osteoarthritis detected by radiography. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 12 Suppl A:S10-19.
58. Burr DB (2004) Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 12 Suppl A:S20-30.
59. Holmdahl R, Jansson L, Andersson M, & Jonsson R (1992) Genetic, hormonal and behavioural influence on spontaneously developing arthritis in normal mice. *Clinical and experimental immunology* 88(3):467-472.
60. Stoop R, et al. (1999) Type II collagen degradation in spontaneous osteoarthritis in C57Bl/6 and BALB/c mice. *Arthritis and rheumatism* 42(11):2381-2389.

61. Huebner JL, Otterness IG, Freund EM, Caterson B, & Kraus VB (1998) Collagenase 1 and collagenase 3 expression in a guinea pig model of osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 41(5):877-890.
62. Grynpas MD, *et al.* (1994) Analysis of collagens solubilized from cartilage of normal and spontaneously osteoarthritic rhesus monkeys. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 2(4):227-234.
63. Olsewski JM, Lust G, Rendano VT, & Summers BA (1983) Degenerative joint disease: multiple joint involvement in young and mature dogs. *American journal of veterinary research* 44(7):1300-1308.
64. McNulty MA, *et al.* (2012) Histopathology of naturally occurring and surgically induced osteoarthritis in mice. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 20(8):949-956.
65. Poole R, *et al.* (2010) Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 18 Suppl 3:S10-16.
66. Janusz MJ, *et al.* (2004) Detection of aggrecanase- and MMP-generated catabolic neoepitopes in the rat iodoacetate model of cartilage degeneration. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 12(9):720-728.
67. van der Kraan PM, Vitters EL, van Beuningen HM, van de Putte LB, & van den Berg WB (1990) Degenerative knee joint lesions in mice after a single intra-articular collagenase injection. A new model of osteoarthritis. *Journal of experimental pathology* 71(1):19-31.
68. Glasson SS, Blanchet TJ, & Morris EA (2007) The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 15(9):1061-1069.
69. Slominski A, Wortsman J, Luger T, Paus R, & Solomon S (2000) Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiological reviews* 80(3):979-1020.
70. Gantz I & Fong TM (2003) The melanocortin system. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 284(3):E468-474.
71. Brzoska T, Luger TA, Maaser C, Abels C, & Bohm M (2008) Alpha-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. *Endocrine reviews* 29(5):581-602.
72. Lipton JM & Catania A (1997) Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator alpha-MSH. *Immunology today* 18(3):140-145.
73. Luger TA, Scholzen TE, Brzoska T, & Bohm M (2003) New insights into the functions of alpha-MSH and related peptides in the immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 994:133-140.
74. Getting SJ (2006) Targeting melanocortin receptors as potential novel therapeutics. *Pharmacology & therapeutics* 111(1):1-15.
75. Bohm M, Luger TA, Tobin DJ, & Garcia-Borrón JC (2006) Melanocortin receptor ligands: new horizons for skin biology and clinical dermatology. *The Journal of investigative dermatology* 126(9):1966-1975.
76. Schiöth HB (2001) The physiological role of melanocortin receptors. *Vitamins and hormones* 63:195-232.
77. Denko CW, Aponte J, Gabriel P, & Petricevic M (1986) beta-Endorphin, immunological and biochemical changes in synovial fluid in rheumatic disorders. *Clinical rheumatology* 5(1):25-32.
78. Suzuki N, Yoshino S, & Nakamura H (1992) [A study of opioid peptides in synovial fluid and synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis]. *Arerugi = [Allergy]* 41(5):615-620.
79. Catania A, *et al.* (1994) The anticytokine neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone in synovial fluid of patients with rheumatic diseases: comparisons with other anticytokine molecules. *Neuroimmunomodulation* 1(5):321-328.

80. Takeba Y, Suzuki N, Kaneko A, Asai T, & Sakane T (2001) Endorphin and enkephalin ameliorate excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 28(10):2176-2183.
81. Andjelkov N, et al. (2006) Detection of mRNA transcripts of truncated opiate precursor (POMC) in human cartilage. *Cell biochemistry and function* 24(3):229-235.
82. Grassel S, et al. (2009) The melanocortin system in articular chondrocytes: melanocortin receptors, pro-opiomelanocortin, precursor proteases, and a regulatory effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone on proinflammatory cytokines and extracellular matrix components. *Arthritis and rheumatism* 60(10):3017-3027.
83. Castano MT, et al. (1991) Autoradiographic evidence of 125I-beta-endorphin binding sites in the articular cartilage of the rat. *Life sciences* 49(15):PL103-105.
84. Freire-Garabal M, et al. (1992) Autoradiographic evidence of opioid binding sites in rat growth plate chondrocytes. *Neuroendocrinology* 55(3):357-359.
85. Keates HL, Cramond T, & Smith MT (1999) Intraarticular and periarticular opioid binding in inflamed tissue in experimental canine arthritis. *Anesthesia and analgesia* 89(2):409-415.
86. Elvenes J, et al. (2003) Expression of functional mu-opioid receptors in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 311(1):202-207.
87. Dumont LM, Wu CS, Tatnell MA, Cornish J, & Mountjoy KG (2005) Evidence for direct actions of melanocortin peptides on bone metabolism. *Peptides* 26(10):1929-1935.
88. Zhong Q, et al. (2005) Multiple melanocortin receptors are expressed in bone cells. *Bone* 36(5):820-831.
89. Ceriani G, Diaz J, Murphree S, Catania A, & Lipton JM (1994) The neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits experimental arthritis in rats. *Neuroimmunomodulation* 1(1):28-32.
90. Vessillier S, et al. (2012) Molecular engineering of short half-life small peptides (VIP, alphaMSH and gamma(3)MSH) fused to latency-associated peptide results in improved anti-inflammatory therapeutics. *Annals of the rheumatic diseases* 71(1):143-149.
91. Patel HB, et al. (2010) Anti-inflammatory and antiosteoclastogenesis properties of endogenous melanocortin receptor type 3 in experimental arthritis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24(12):4835-4843.
92. Yin H, et al. (2005) Beta-endorphin prevents collagen induced arthritis by neuroimmuno-regulation pathway. *Neuro endocrinology letters* 26(6):739-744.
93. Getting SJ, Allcock GH, Flower R, & Perretti M (2001) Natural and synthetic agonists of the melanocortin receptor type 3 possess anti-inflammatory properties. *Journal of leukocyte biology* 69(1):98-104.
94. Zaidi M, et al. (2010) ACTH protects against glucocorticoid-induced osteonecrosis of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(19):8782-8787.
95. Yeh JK, Evans JF, Niu QT, & Aloia JF (2006) A possible role for melanocortin peptides in longitudinal growth. *The Journal of endocrinology* 191(3):677-686.
96. Cornish J, et al. (2003) alpha -melanocyte-stimulating hormone is a novel regulator of bone. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 284(6):E1181-1190.
97. Robbins LS, et al. (1993) Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72(6):827-834.
98. Hearing VJ & Tsukamoto K (1991) Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5(14):2902-2909.
99. Jimenez M, Tsukamoto K, & Hearing VJ (1991) Tyrosinases from two different loci are expressed by normal and by transformed melanocytes. *The Journal of biological chemistry* 266(2):1147-1156.

100. Kwon BS, Wakulchik M, Haq AK, Halaban R, & Kestler D (1988) Sequence analysis of mouse tyrosinase cDNA and the effect of melanotropin on its gene expression. *Biochemical and biophysical research communications* 153(3):1301-1309.
101. Hoganson GE, Ledwitz-Rigby F, Davidson RL, & Fuller BB (1989) Regulation of tyrosinase mRNA levels in mouse melanoma cell clones by melanocyte-stimulating hormone and cyclic AMP. *Somatic cell and molecular genetics* 15(3):255-263.
102. Wong G & Pawelek J (1975) Melanocyte-stimulating hormone promotes activation of pre-existing tyrosinase molecules in Cloudman S91 melanoma cells. *Nature* 255(5510):644-646.
103. Halaban R, Pomerantz SH, Marshall S, & Lerner AB (1984) Tyrosinase activity and abundance in Cloudman melanoma cells. *Archives of biochemistry and biophysics* 230(1):383-387.
104. Burchill SA, Thody AJ, & Ito S (1986) Melanocyte-stimulating hormone, tyrosinase activity and the regulation of eumelanogenesis and phaeomelanogenesis in the hair follicular melanocytes of the mouse. *The Journal of endocrinology* 109(1):15-21.
105. Drissi H, Zuscik M, Rosier R, & O'Keefe R (2005) Transcriptional regulation of chondrocyte maturation: potential involvement of transcription factors in OA pathogenesis. *Molecular aspects of medicine* 26(3):169-179.
106. van Osch GJ, van der Kraan PM, Blankevoort L, Huiskes R, & van den Berg WB (1996) Relation of ligament damage with site specific cartilage loss and osteophyte formation in collagenase induced osteoarthritis in mice. *The Journal of rheumatology* 23(7):1227-1232.
107. Joosten LA, *et al.* (2004) Interleukin-18 promotes joint inflammation and induces interleukin-1-driven cartilage destruction. *The American journal of pathology* 165(3):959-967.
108. Ichiyama T, *et al.* (1999) Inhibition of peripheral NF-kappaB activation by central action of alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Journal of neuroimmunology* 99(2):211-217.
109. Getting SJ, Schioth HB, & Perretti M (2003) Dissection of the anti-inflammatory effect of the core and C-terminal (KPV) alpha-melanocyte-stimulating hormone peptides. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 306(2):631-637.
110. Maaser C, *et al.* (2006) Crucial role of the melanocortin receptor MC1R in experimental colitis. *Gut* 55(10):1415-1422.
111. Yoon SW, Chun JS, Sung MH, Kim JY, & Poo H (2008) alpha-MSH inhibits TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-13 expression by modulating p38 kinase and nuclear factor kappaB signaling in human chondrosarcoma HTB-94 cells. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 16(1):115-124.
112. Christgau S, *et al.* (2004) Suppression of elevated cartilage turnover in postmenopausal women and in ovariectomized rats by estrogen and a selective estrogen-receptor modulator (SERM). *Menopause* 11(5):508-518.
113. Hoegh-Andersen P, *et al.* (2004) Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application. *Arthritis research & therapy* 6(2):R169-180.
114. Hirobe T, Kiuchi M, Wakamatsu K, & Ito S (2010) Estrogen increases hair pigmentation in female recessive yellow mice. *Zoological science* 27(6):470-476.
115. Muraoka T, Hagino H, Okano T, Enokida M, & Teshima R (2007) Role of subchondral bone in osteoarthritis development: a comparative study of two strains of guinea pigs with and without spontaneously occurring osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 56(10):3366-3374.
116. Dore D, Quinn S, Ding C, Winzenberg T, & Jones G (2009) Correlates of subchondral BMD: a cross-sectional study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 24(12):2007-2015.
117. McErlain DD, *et al.* (2008) Study of subchondral bone adaptations in a rodent surgical model of OA using in vivo micro-computed tomography. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 16(4):458-469.
118. Morenko BJ, *et al.* (2004) In vivo micro computed tomography of subchondral bone in the rat after intra-articular administration of monosodium iodoacetate. *Contemporary*

- topics in laboratory animal science / American Association for Laboratory Animal Science* 43(1):39-43.
119. Hayami T, *et al.* (2006) Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone* 38(2):234-243.
 120. Mastbergen SC & Lafeber FP (2011) Changes in subchondral bone early in the development of osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 63(9):2561-2563.
 121. Bolbos RI, *et al.* (2008) Relationship between trabecular bone structure and articular cartilage morphology and relaxation times in early OA of the knee joint using parallel MRI at 3 T. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 16(10):1150-1159.
 122. Stenstrom A, Hansson LI, & Thorngren KG (1979) Influence of alpha-MSH and ACTH on cortical bone remodelling in hypophysectomized rats. *Experientia* 35(1):132-133.

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μCT	Mikrofokale Computertomographie
Abb.	Abbildung
ACLT	Anterior Cruciate Ligament Transection
ACTH	Adrenocortikotropes Hormon
cAMP	Zyklisches AMP
CO ₂	Kohlendioxid
DMM	Destabilisierung des medialen Meniskus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
h	Stunde
HCl	Salzsäure
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KGW	Körpergewicht
MCs	Melanocortine
MC-R	Melanocortin-Rezeptor
Mc1r	MC-1R signaldefiziente Mäuse
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMTL	Mediales meniskotibiales Ligament
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NSAIDs	Nicht-steroidale Antiphlogistika
OA	Osteoarthritis

OR	Opioid-Rezeptor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Prohormon-Convertase
PFA	Paraformaldehyd
POMC	Proopiomelanocortin
RA	Rheumatoide Arthritis
SKP	SKP
SLRPs	Small leucin-rich proteoglycans
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumor-nekrosis factor α
WT	Wildtyp-Mäuse
ZNS	Zentrales Nervensystem

10. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch ihre Unterstützung und ihr Interesse zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Meiner Betreuerin **Priv.-Doz. Dr. Susanne Grässel** (Orthopädische Klinik der Universität Regensburg) danke ich für die Themenstellung, die kompetente Anleitung und die vielseitige Unterstützung sowie die Förderung zur Teilnahme an Kongressen.

Frau **Dr. Julia Kaps**, die mich während der gesamten Arbeit fachlich unterstützt und betreut hat und die mir auch als Freundin immer zur Seite stand.

Mein herzlicher Dank gilt auch **Prof. Dr. med. Dr. h.c. Joachim Grifka** (Orthopädische Klinik der Universität Regensburg) für den Arbeitsplatz, für die hervorragende Ausstattung, die finanziellen Möglichkeiten, sein großes Interesse an der Grundlagenforschung sowie die tollen Betriebsfeiern.

Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Fred Sinowatz (Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München) möchte ich ganz herzlich danken für die Promotionsmöglichkeit an seinem Lehrstuhl und für die Übernahme des Erstgutachtens.

Allen Mitarbeitern des ZMB danke ich für das angenehme Arbeitsklima, die nette Zusammenarbeit und die fachliche Unterstützung von allen Seiten.

Ganz besonderer Dank gilt **meiner Familie**, die mir schon so lange zur Seite steht und **meinen Freunden**, auf die ich immer zählen kann.